

Universidade Nova de Lisboa
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa

Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura

DAVID Alexandre Martins Tavares **RUSSO**

Dissertação apresentada à Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, para a obtenção do grau de Mestre em Energia e Bioenergia

Orientador: Professor Doutor Nuno Lapa

Lisboa
2011

Aos meus Pais, Irmão e à Ana.

FICHA TÉCNICA

Título: Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura

Autor: David Alexandre Martins Tavares Russo

Objectivo do presente trabalho: Dissertação apresentada à Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, para a obtenção do grau de Mestre em Energia e Bioenergia

Orientação científica do trabalho: Professor Doutor Nuno Lapa (Professor Auxiliar da UNL/FCT/DCTB)

Contactos do autor: davidarusso@gmail.com

Local: Monte da Caparica

Ano: 2011

O conteúdo da presente dissertação é da inteira responsabilidade do autor.

Não é autorizada a reprodução, total ou parcial, do conteúdo da presente dissertação, sem a autorização prévia do autor, por escrito.

É autorizada a citação do conteúdo da presente dissertação, desde que acompanhada da respectiva referência bibliográfica, de acordo com as normas internacionais e de citação de trabalhos científicos.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Nuno Lapa, pela oportunidade de desenvolver este trabalho sob a sua orientação, pelo apoio constante e o tempo que generosamente me dedicou, pela sua crítica, sempre construtiva, e análise rigorosa ao longo de todo o trabalho.

Ao DCTB-FCT-UNL, na pessoa da sua Presidente, Professora Doutora Benilde Mendes, por me ter permitido frequentar e adquirir novos conhecimentos no Mestrado em Energia e Bioenergia e por ter disponibilizado todos os meios existentes nos laboratórios do DCTB para a realização do presente trabalho.

À Simarsul pelas visitas técnicas à ETAR de Fernão Ferro, pela disponibilização dos meios necessários para a recolha das amostras, e pela abertura em colaborar comigo e com o DCTB-FCT-UNL.

Ao DB-LNEG, na pessoa da Doutora Luísa Gouveia, pelo fornecimento do material biológico e pela abertura demonstrada nas visitas às instalações.

Ao Eng.^o Rui Barbosa pelo acompanhamento, disponibilidade permanente e pelos ensinamentos prestados nas mais variadas áreas.

Ao Eng.^o João Morais pelos ensinamentos prestados e partilha de conhecimentos.

Os meus agradecimentos à Sr.^a Rita Braga e à Sr.^a Rosa, pelo apoio, pela simpatia e disponibilidade no esclarecimento de dúvidas relativas ao funcionamento dos equipamentos e armazenamento de reagentes durante a realização das análises laboratoriais

ÍNDICE

ÍNDICE	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE QUADROS	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT	XII
SIMBOLOGIA.....	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A situação energética actual	1
1.2. Águas Residuais e seus tratamentos.....	3
1.2.1. Processos de tratamento de águas residuais urbanas	4
1.2.1.1. Tratamentos preliminares.....	4
1.2.1.2. Tratamento primário.....	5
1.2.1.3. Tratamentos secundários.....	5
1.2.1.4. Tratamento terciário	7
1.3. Microalgas em Bioenergia e no Tratamento de Efluentes	8
1.3.1. Definição de microalga.....	8
1.3.2. Perspectiva histórica.....	8
1.3.3. Crescimento celular e parâmetros que o caracterizam.....	10
1.3.4. Eficiência fotossintética.....	16
1.3.5. Géneros e espécies de microalgas utilizados em Bioenergia e sua importância	18
1.3.6. Meios de cultura	21
1.3.7. Métodos de cultivo	24
1.3.7.1. Sistemas “abertos” de cultura de microalgas	24
1.3.7.2. Sistemas “fechados” de cultura de microalgas (fotobioreactores)	25
1.4. A importância das microalgas na depuração de água residuais.....	29
1.4.1. O azoto e o fósforo	29
1.4.2. Remoção biológica de nutrientes	31
1.4.3. O papel das microalgas na remoção de nutrientes	31
1.4.4. Crescimento de microalgas em águas residuais	33
1.4.5. Efeito da intensidade luminosa e fotoperíodo no crescimento microalgal	36
1.4.6. Efeito da temperatura no crescimento microalgal	38
1.4.7. Objectivos da presente dissertação	39

2. MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1. Caracterização da ETAR	41
2.2. Colheita de água residual.....	44
2.3. Caracterização química da água residual.....	46
2.4. Caracterização da microalga	51
2.5. Condições de incubação e crescimento.....	51
2.5.1. Meios de cultura	55
3. RESULTADOS	58
3.1. Caracterização química da água residual	58
3.2. Ensaio de crescimento microalgal.....	59
3.3. Taxas específicas de crescimento	73
3.4. Taxas de remoção de azoto e fósforo.....	73
3.5. Taxas volumétricas de formação de biomassa e consumo de nutrientes.....	74
3.6. Quocientes metabólicos de consumo de azoto e fósforo por unidade de biomassa	75
3.7. Taxas específicas de consumo de nutrientes.....	75
3.8. Tempo de duplicação celulares.....	76
4 – DISCUSSÃO	77
4.1. Alteração da espécie dominante na cultura de microalgas	77
4.2. Comparação da água residual tratada com alguns dados bibliográficos	78
4.3. Ensaio de crescimento.....	79
4.3.1. Ensaio preliminar de cultivo em meio ISO 8692	79
4.3.2. Ensaio preliminar de cultivo na água residual tratada	80
4.3.3. Ensaio de cultivo em condições de Verão no meio ISO 8692.....	80
4.3.4. Ensaio de cultivo em condições de Verão na água residual tratada	81
4.3.5. Ensaio de cultivo em condições de Inverno no meio ISO 8692	83
4.3.6. Ensaio de cultivo em condições de Inverno na água residual tratada	83
4.4. Razão N:P	85
5 – CONCLUSÕES	87
6 – TRABALHO FUTURO	90
7 – BIBLIOGRAFIA	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. – Variação de biomassa numa cultura descontínua	14
Figura 1.2. – Regressão linear da curva de crescimento	15
Figura 1.3. – Cadeia de processos no cultivo de microalgas	22
Figura 1.4. – Diagrama de uma lagoa raceway	25
Figura 1.5. – Diferentes fotobioreactores existentes	27
Figura 2.1. – Fotografia aérea da ETAR de Fernão Ferro	43
Figura 2.2. – Interior da ETAR de Fernão Ferro	44
Figura 2.3. – Amostrador automático da marca ISCO Modelo 3700.....	45
Figura 2.4. – Sondas e eléctrodos utilizados nas medições in-situ. A – pH; B – Condutividade; C – Potencial redox; D – Oxigénio dissolvido; E – Temperatura;	46
Figura 2.5. – Sistema de crescimento utilizado nos ensaios que simulavam as condições de Verão e Inverno	53
Figura 2.6. – Esquema representativo do sistema de crescimento.....	54
Figura 3.1. – Variação da DO/DO_0 vs tempo nos ensaios brancos	61
Figura 3.2. – Variação da DO/DO_0 vs tempo.....	62
Figura 3.3. – Variação do logaritmo de DO/DO_0 vs tempo	63
Figura 3.4. – Variação dos SST/SST_0 vs tempo nos ensaios brancos	64
Figura 3.5. – Variação dos SST/SST_0 vs tempo	65
Figura 3.6. – Variação do logaritmo de SST/SST_0 vs tempo.....	66
Figura 3.7. – Variação de N vs tempo nos ensaios brancos.....	67
Figura 3.8. – Variação de N vs tempo	68
Figura 3.9. – Variação de P vs tempo nos ensaios brancos	69
Figura 3.10. – Variação de P vs tempo	70
Figura 3.11. – Variação de $(1 - N/N_0)$ vs tempo	71
Figura 3.12. – Variação de $(1 - P/P_0)$ vs tempo	72
Figura 4.1. – Imagens obtidas da cultura-mãe após 6 dias de incubação. A – <i>Chlorella</i> <i>vulgaris</i> (ampliação 400x); B – <i>Scenedesmus</i> sp. (ampliação 400x); C – <i>Scenedesmus</i> sp (ampliação 400x).....	77
Figura 4.2. – Imagem de um protozoário ciliado na água residual inoculada, após 14 dias de incubação (ampliação 400x).....	77
Figura 4.3. – Água residual inoculada, após 14 dias de incubação, mostrando a dominância de <i>Chlamydomonas</i> (ampliação 400x).....	78

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.1. – Conteúdo em óleo de alguns géneros e espécies de microalgas	20
Quadro 1.2. – Produção e espaço de instalação de várias culturas	20
Quadro 1.3. – ETARs que utilizam microalgas na depuração de águas residuais	32
Quadro 1.4. – Peso seco e % de remoção de NO_3 e P	33
Quadro 1.5. – Constituição da água residual utilizada no trabalho	34
Quadro 1.6. – Taxas de crescimento e remoção de NH_4 e PO_4 obtidas no trabalho	35
Quadro 1.7. – Taxas de crescimento e respectivas temperaturas de ensaio de vários autores	36
Quadro 2.1. – Composição das soluções-mãe utilizadas na preparação do meio de cultura mineral.....	56
Quadro 2.2. – Marcas e os graus de pureza dos compostos químicos utilizados na preparação das soluções-mãe do meio nutritivo mineral.....	57
Quadro 3.1. – Caracterização físico-química do efluente tratado da ETAR de Fernão Ferro.....	58
Quadro 3.2. – Caracterização química do meio ISO 8692	58
Quadro 3.3. – Razões N:P para os diversos ensaios	59
Quadro 3.4. – Taxas específicas de crescimento determinadas para cada meio de cultura e para cada condição de incubação	73
Quadro 3.5. – Taxas de remoção de azoto e fósforo para a totalidade da duração dos ensaios de crescimento	73
Quadro 3.6. – Taxas de remoção de azoto e fósforo nas fases de crescimento exponencial.....	74
Quadro 3.7. – Taxas volumétricas de formação de biomassa (TVSST) e de consumo de nutrientes (TVN e TVP)	74
Quadro 3.8. – Quocientes metabólicos de consumo de azoto e fósforo por unidade de biomassa	75
Quadro 3.9. – Taxas específicas de consumo de nutrientes	76
Quadro 3.10. – Tempos de duplicação celulares.....	76
Quadro 4.1. – Composição de várias águas residuais utilizadas noutros trabalhos	78
Quadro 4.2. – Constituição da microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	85

RESUMO

Uma das vertentes da Bioenergia é a utilização das microalgas para produção energética. Este aproveitamento, quando efectuado de forma isolada, é considerado por diversos autores como não sendo economicamente viável, daí procurarem-se sistemas integrados de crescimento microalgal. Estes sistemas juntam a produção de componentes com valor energético, o sequestro de CO₂, a depuração de águas residuais e a extracção de substâncias com elevado valor comercial (pigmentos, substâncias anti-oxidantes, entre outros).

O objectivo principal deste trabalho foi o estudo da cinética de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual, a qual foi previamente submetida a um tratamento biológico aeróbio sem remoção de N e P, e sem ser submetida a qualquer tipo de pré-tratamento em laboratório (nomeadamente desinfecção). Pretendeu-se também avaliar a taxa de remoção dos nutrientes N e P no decurso do crescimento microalgal. Foi simulado o crescimento da microalga em condições meteorológicas de Verão e de Inverno, com diferenças de incubação no que diz respeito ao fotoperíodo e à temperatura (Inverno: temperatura de 10°C e fotoperíodo de 6h de luz/18h de escuro; Verão: temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12h de luz/12h de escuro), tendo-se comparado o seu crescimento no meio de cultura sintético ISO 8692 e na água residual tratada.

A água residual tratada foi colhida na ETAR de Fernão Ferro, a qual é explorada pela empresa Simarsul. O nível de tratamento instalado é terciário, dispondo de desinfecção do efluente final. A água residual foi colhida a jusante do sistema de desinfecção por sistema de ultravioletas, ou seja, após a fase terciária do tratamento.

No ensaio preliminar de cultivo das microalgas, o qual foi realizado com o objectivo de se testarem as condições de incubação e arejamento das culturas, foram registadas taxas específicas de crescimento, relativamente à Densidade Óptica (DO), de 0,253 d⁻¹,

para o crescimento no meio ISO 8692, e de $0,496\text{ d}^{-1}$, para o crescimento na água residual tratada.

No ensaio em condições de incubação de Verão obtiveram-se taxas específicas de crescimento, relativamente à DO, de $0,657\text{ d}^{-1}$ para o crescimento no meio sintético ISO 8692, com taxas de remoção de N de 37% e de P de 67%, relativamente às concentrações iniciais, e de $0,430\text{ d}^{-1}$ para o crescimento na água residual tratada, com taxas de remoção de N de 84% e de P de 74%, relativamente às concentrações iniciais.

No ensaio em condições de Inverno obtiveram-se taxas específicas de crescimento, no que diz respeito à DO, de $0,166\text{ d}^{-1}$ para o crescimento no meio ISO 8692, com taxas de remoção de N de 35% e de P de 50%, relativamente às concentrações iniciais, e de $0,176\text{ d}^{-1}$ para o crescimento na água residual tratada, com taxas de remoção de N de 84% e de P de 56%, relativamente às concentrações iniciais.

Concluiu-se que as taxas de crescimento mais elevadas foram registadas no meio sintético, em condições de incubação de Verão, e que o meio que registou as taxas de remoção de nutrientes mais elevadas, na globalidade dos ensaios, foi a água residual tratada. Este resultado, relativamente à água residual tratada, constitui um excelente indicador para uma futura aplicação destas microalgas num sistema de produção de biomassa microalgal que tenha também como objectivo a remoção de N e P da água residual.

Palavras-chave:

Água residual doméstica, *Chlorella vulgaris*, temperatura, fotoperíodo, crescimento, remoção de N e P

ABSTRACT

One of the many areas of Bioenergy is the use of microalgae for energy production. Many authors have demonstrated that isolated systems are not economically viable. Therefore studies have looked into integrated solutions. These integrated systems combine the production of microalgae components with energetic value, CO₂ capture, wastewater treatment and extraction of valuable commercial substances (pigments, anti-oxidant substances, among others).

The main aim of this thesis was to study the growth kinetics of the microalga *Chlorella vulgaris* in wastewater that has been submitted to an aerobic biological treatment without Nitrogen and Phosphorous removal. The wastewater samples weren't submitted to any laboratorial preliminary treatment (namely disinfection). It was also evaluated the nutrient removal rates as the microalga grows. Microalgal growth took place with temperature and photoperiod variations that simulated summer and winter meteorological conditions (winter: temperature of 10°C, using a 6/18h light/dark photoperiod cycle; summer: temperature of 20°C, using a 12/12h light/dark photoperiod cycle). Growth parameters were compared by using two different culture media: the medium described in ISO 8692 and the treated wastewater.

The treated wastewater was collected at Fernão Ferro wastewater treatment plant (WWTP), which is exploited by Simarsul. The WWTP employs a tertiary treatment level with a final effluent disinfection system. The treated wastewater was collected downstream of the ultraviolet disinfection system which constitutes the tertiary treatment level in this WWTP.

The preliminary growth experiment, which took place to test the incubation and aeration conditions, registered a specific growth rate, based in Optical Density (OD), of 0.253 d⁻¹ in ISO 8692 growth medium and 0.496 d⁻¹ in the treated wastewater.

The experiment in summer conditions registered a specific growth rate, based in OD, of 0.657 d⁻¹ in ISO 8692 growth medium with nutrient removal rates of N = 37% and P = 67%, compared to the initial concentrations, and of 0.430 d⁻¹ in treated wastewater

with nutrient removal rates, compared to the initial concentrations, of N = 84% and P = 74%.

The experiment in winter conditions presented a specific growth rate, based in OD, of 0.166 d^{-1} in ISO 8692 growth medium with nutrient removal rates of N = 35% and P = 50%, compared to the initial concentrations, and of 0.176 d^{-1} in treated wastewater with nutrient removal rates, compared to the initial concentrations, of N = 84% and P = 56%.

It was concluded that the highest specific growth rates were registered in the synthetic medium ISO 8692, under summer incubation conditions, and the highest nutrient removal rates were determined in treated wastewater for same incubation conditions. This result in treated wastewater constitutes an excellent indicator towards the future application of this microalga in a microalgae biomass production system that integrates wastewater nutrient removal.

Keywords:

Domestic wastewater, *Chlorella vulgaris*, temperature, photoperiod, growth, N and P removal

SIMBOLOGIA

TEC N – Taxa Específica de Consumo de Azoto

TEC P – Taxa Específica de Consumo de Fósforo

TVb_t – Taxa Volumétrica de Formação de Biomassa

TVN – Taxa Volumétrica de Consumo de Azoto

TVP – Taxa Volumétrica de Consumo de Fósforo

TVSST – Taxa Volumétrica de Formação de Sólidos Suspensos Totais

TVS_t – Taxa Volumétrica de Consumo de Substrato

μ_b – Taxa Específica de Crescimento da Biomassa

1. INTRODUÇÃO

1.1. A situação energética actual

A energia desempenha um papel fundamental em todas as actividades, tendo o desenvolvimento sócio-económico, das últimas décadas, sido pautado por um forte crescimento do consumo energético, proveniente essencialmente de combustíveis fósseis.

A fonte energética primária para os transportes mundiais é o petróleo. As necessidades mundiais são de 84 milhões de barris (CIA, 2010). Enquanto as sociedades ditas desenvolvidas estão em crescimento contínuo, economias emergentes como a Índia e a China estão a contribuir, de forma drástica, para a pressão antropogénica sobre as fontes energéticas num futuro muito próximo.

Não é de menosprezar também a importância que o petróleo tem na produção de produtos plásticos e substâncias químicas, muitas delas provenientes directamente das refinarias.

O aumento do consumo de petróleo que ocorreu na década de 70, associado à escalada do seu preço, tornou a energia num importante factor de produção, passando a constituir uma problemática política e estratégica central, a nível mundial. Neste contexto, os choques petrolíferos ocorridos nos anos 70 e, posteriormente, as situações semelhantes ocorridas nos anos 80 impuseram a necessidade de procurar formas alternativas de produção energética.

Em 1987 foi publicado o Relatório Brundtland (documento intitulado *“Our Common Future”*) pela Comissão Mundial sobre Ambiente e Desenvolvimento. É neste documento que surge o conceito de desenvolvimento sustentável, definido como “o desenvolvimento que satisfaz as necessidades presentes, sem comprometer a capacidade das gerações futuras de suprir as suas próprias necessidades”.

Passados mais de dez anos foi ratificado o “Protocolo de Quioto” que vinculava os países a reduzir a emissão de gases com efeito de estufa em 5,2% em relação aos níveis de 1990, no período entre 2008 e 2012. Apesar de alguns esforços nesse sentido, este objectivo não foi atingido globalmente. Em Dezembro de 2009, a ONU promoveu uma cimeira com os líderes mundiais conhecida como a Conferência de Copenhaga. Esta conferência tinha por objectivo reflectir sobre o que foi feito desde 1999 e discutir futuros vínculos. Contudo, os objectivos iniciais da conferência não foram atingidos, tendo terminado sem qualquer compromisso oficial (Garcia, 2009).

O conceito de economia sustentável foi difundido na última década, em que os esforços para reduzir o consumo energético têm sido alvo de um mediatismo sem precedentes. Este fenómeno levou a que fossem canalizados fundos para unidades de investigação e desenvolvimento no sector das energias renováveis. Apesar de crucial, a tecnologia aplicada nesta área não atingiu ainda a maturidade necessária para suprir as necessidades energéticas actuais. Também tem estado sob escrutínio o ciclo de vida das fontes de energia renováveis, para determinar quais as suas verdadeiras vantagens em relação às fontes fósseis.

Um dos sectores mais promissores das energias renováveis é a Bioenergia. A Bioenergia pode ser definida como energia ou calor gerados a partir de biomassa. No sentido mais alargado, os campos sociais, económicos, científicos e técnicos associados à produção de energia de fontes biológicas estão englobados no termo Bioenergia (ALTENER, 2004).

No sector da Bioenergia destacam-se naturalmente as indústrias da biomassa e dos biocombustíveis. As centrais de biomassa portuguesas não tiveram o sucesso desejado, mas, no Norte da Europa, são uma fonte de energia importante. Já os biocombustíveis possuem um mercado interessante dentro e fora de Portugal (Sequeira, 2010).

Os biocombustíveis de primeira geração têm como matéria-prima o açúcar, o amido, o óleo vegetal ou as gorduras animais. As críticas dirigidas a esta primeira geração de

biocombustíveis fundamentam-se no facto da maioria destas matérias-primas, à excepção dos resíduos, serem essenciais na alimentação humana e animal, mais do que na produção de combustíveis. A segunda geração já se baseia em culturas não alimentares e resíduos como fonte de óleos. Tecnologias mais recentes como a BTL (*biomass to liquid*) e Fischer-Tropsch são utilizadas na conversão de biomassa em bioenergia. Finalmente, a terceira geração já assenta a sua produção nas microalgas, procurando usufruir do potencial delas para a produção energética (Dermibas, 2008).

1.2. Águas residuais e seus tratamentos

Todas as comunidades produzem resíduos, sejam líquidos, sólidos ou gasosos. Os resíduos líquidos, ou águas residuais, são essencialmente a água proveniente das zonas urbanas e industriais, após a sua utilização (Tchobanoglous *et al.*, 2003).

O desenvolvimento sustentável implica a necessidade de controlar as descargas de águas residuais domésticas e urbanas que são produzidas pela população nas suas actividades diárias, sendo necessário providenciar um tratamento apropriado a essas descargas, para que se possa cumprir o objectivo de um bom estado ecológico das águas superficiais e subterrâneas.

A União Europeia entendeu como necessário defender os recursos naturais de forma a evitar que o ambiente fosse deteriorado pela eliminação de águas residuais urbanas insuficientemente tratadas, tendo criado, com o estabelecimento da Directiva 91/271/CEE do Conselho, de 21 de Maio, mecanismos legislativos com vista à harmonização das leis internas dos vários Estados-Membros.

A transposição desta Directiva para o direito interno português foi realizada através do Decreto-Lei nº 152/97, de 19 de Junho, cujas disposições se aplicam à recolha, tratamento e descarga de águas residuais urbanas em meio aquático. Aí estão definidas as metas temporais e os níveis de tratamento que deverão orientar a acção das entidades responsáveis na melhoria dos níveis de atendimento e qualidade de serviço dos sistemas de drenagem pública e tratamento de águas residuais. Este

Decreto-Lei identifica ainda zonas sensíveis e zonas menos sensíveis, diferenciando os graus de exigência no nível de tratamento que é necessário proporcionar.

O cumprimento da legislação em vigor tem resultado, nos últimos anos, num aumento significativo de população servida por Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs). No subcapítulo seguinte são descritos alguns dos métodos de tratamento mais aplicados às águas residuais urbanas, dando-se ênfase especial aos tipos de órgãos existentes na ETAR de Fernão Ferro, dado que foi nesta ETAR que se obtiveram as amostras de água residual tratada que foram utilizadas na presente dissertação.

1.2.1. Processos de tratamento de águas residuais urbanas

A escolha de um sistema de tratamento para as águas residuais urbanas é determinada pelas características quantitativas e qualitativas dessas águas residuais, localização do sistema e objectivos de qualidade que se pretendem atingir (Tchobanoglous *et al.*, 2003)

1.2.1.1. Tratamento preliminar

Numa ETAR, as águas residuais passam por vários processos de tratamento com o objectivo de se eliminar a matéria poluente da água. No primeiro conjunto de tratamentos, designados por tratamento preliminar, a água residual é sujeita a processos de separação dos sólidos mais grosseiros, por meio de gradagem ou tamisagem, remoção de areias e remoção de óleos e gorduras.

As operações unitárias de gradagem ou tamisagem têm o objectivo de remover sólidos grosseiros, de dimensões maiores do que as aberturas dos equipamentos utilizados (grades ou tamisadores), impedindo ainda a flutuação de detritos nos equipamentos a jusante, o entupimento de canalizações e o desgaste ou bloqueamento de equipamentos mecânicos. As operações unitárias de desarenamento e desengorduramento têm como finalidade remover as areias e gorduras existentes na água residual (Azevedo, 2003).

Nesta fase, o efluente também é preparado para as fases de tratamento subsequentes, podendo ser sujeito a um pré-arejamento e a uma equalização tanto de caudais como de cargas poluentes.

1.2.1.2. Tratamento primário

A primeira fase do tratamento propriamente dito é designada por tratamento primário, onde a fracção sólida é separada da água por sedimentação em decantadores primários. Este processo, exclusivamente de acção física, pode, em alguns casos, ser auxiliado pela adição de agentes químicos que, através da coagulação-floculação, possibilitam a obtenção de flocos de matéria sólida de maiores dimensões e, assim, mais facilmente decantáveis.

Após o tratamento primário, a matéria poluente que permanece no efluente tem dimensões reduzidas, sendo normalmente constituída por colóides e matéria orgânica dissolvida, não sendo por isso passível de ser removida por processos exclusivamente físico-químicos (Tchobanoglous *et al.*, 2003).

1.2.1.3. Tratamento secundário

Ao tratamento primário seguem-se os processos de tratamento biológicos, também designados por tratamento secundário, onde a matéria poluente coloidal e dissolvida é degradada por microrganismos nos chamados reactores biológicos.

Na maioria dos reactores estão normalmente presentes microrganismos aeróbios e facultativos que apresentam uma elevada taxa de consumo de oxigénio, havendo por isso a necessidade de promover o seu arejamento.

No tratamento secundário existem várias tecnologias que funcionam sobre princípios semelhantes, destacando-se os sistemas aeróbios intensivos, quer por biomassa suspensa (lamas activadas), quer por biomassa fixa (leitos percoladores e discos biológicos) (Tchobanoglous *et al.*, 2003).

No sistema de lamas activadas, o efluente do tratamento preliminar é geralmente encaminhado para o decantador primário, seguindo depois para o tanque de arejamento, o qual recebe geralmente uma recirculação permanente de lamas a partir do decantador secundário. O efluente é então conduzido para o decantador secundário e a partir daí o efluente é descarregado numa linha de água. Uma parte da fracção sólida (lamas) é recirculada para o tanque de arejamento e a parte restante é eliminada do sistema para a linha de tratamento de lamas. A eficiência do tratamento é optimizada com a recirculação das lamas para o tanque de arejamento, pois aumenta a concentração de biomassa adaptada no tanque de arejamento, bem como a velocidade a que o substrato orgânico é degradado.

O processo de injeção de ar ou oxigénio puro para promover a mistura da lama biológica com a água residual no tanque de arejamento e fornecer o oxigénio suficiente para os microrganismos degradarem os compostos orgânicos é conhecido como arejamento.

As valas de oxidação são um tipo de sistemas por lamas activadas, em que os efluentes orgânicos são misturados com uma cultura bacteriana em suspensão. A multiplicação e aglomeração destes microrganismos constituem flocos de bactérias, que decantam quando cessa a agitação.

O efluente saído do reactor biológico é constituído por uma grande quantidade de microrganismos, sendo muito reduzida a matéria poluente remanescente. Os flocos biológicos sofrem seguidamente um processo de sedimentação nos decantadores secundários.

Findo o tratamento secundário, as águas residuais tratadas apresentam um reduzido nível de matéria orgânica, podendo na maioria dos casos, serem admitidas no ambiente receptor (Azevedo, 2003).

1.2.1.4. Tratamento terciário

O tratamento terciário torna-se indispensável quando é necessário proceder à desinfecção das águas residuais tratadas e/ou à remoção de determinados nutrientes, como o azoto e o fósforo, que podem potenciar, isoladamente ou em conjunto, a eutrofização das águas receptoras (Tchobanoglous *et al.*, 2003). Os sistemas de remoção de N e P não serão abordados na presente dissertação, dado que para o crescimento das microalgas é essencial a utilização de um efluente que possua estes nutrientes na sua composição.

Entre as opções de desinfecção contam-se geralmente três tecnologias básicas: adição de cloro, adição de ozono ou canal de desinfecção por radiação ultravioleta.

A cloragem é o sistema de desinfecção mais vulgar, sendo também o mais económico. Este método é eficaz na eliminação de bactérias, porém, é pouco eficaz na eliminação de vírus. Para além disso, os resíduos da cloragem permanecem na corrente filtrada, com graves inconvenientes ambientais (Tchobanoglous *et al.*, 2003).

A desinfecção por ozono apresenta desvantagens semelhantes, embora a uma escala menor. O ozono não se mantém muito tempo na água. No entanto, formam-se no processo subprodutos contaminantes que se mantêm na água tratada.

O sistema de desinfecção por ultravioletas é uma tecnologia mais recente que não produz quaisquer resíduos tóxicos e apresenta óptimos resultados na destruição de vírus e bactérias, sendo considerada actualmente como a solução mais adequada para um tratamento terciário.

Neste processo o efluente é exposto a uma luz ultravioleta de um determinado comprimento de onda e intensidade durante um determinado intervalo de tempo. A eficácia deste processo depende da intensidade da luz ultravioleta, o tempo de contacto e a turbidez do efluente. A radiação ultravioleta não consegue penetrar

sólidos, daí existir a possibilidade da remoção microbiana não ser completa se o efluente apresentar teores elevados de sólidos em suspensão. Alguns locais apenas utilizam a radiação ultravioleta para efluentes com baixo teor em sólidos (Tchobanoglous *et al.*, 2003).

1.3. Microalgas em Bioenergia e no Tratamento de Efluentes

1.3.1. Definição de microalga

Existem muitos modos de definir “microalga”. A ficologia considera que qualquer organismo que contém clorofila *a* e um talo, não diferenciado em raízes, caule e folhas, é uma alga. Na ficologia aplicada, o termo microalga refere-se estritamente a algas microscópicas e às bactérias fotossintéticas aeróbias, as cianobactérias (Tomaselli, 2004)

O mecanismo fotossintético das microalgas é comparável ao das plantas terrestres, mas devido à sua estrutura celular simples, e ao meio líquido em que vivem, apresentam trocas mais eficientes de água, CO₂ e nutrientes do que as plantas superiores, o que conduz a taxas mais elevadas de conversão de energia solar em biomassa (Salisbury e Ross, 1985; Carlsson *et al.*, 2007).

1.3.2. Perspectiva histórica

A ideia de explorar microalgas a nível industrial surgiu, pela primeira vez, na Alemanha, durante a 2ª Guerra Mundial, como fonte barata de proteínas, já que a carne animal era um bem escasso. Nas décadas de 50 e 60 foram feitos diversos esforços na optimização de culturas de algas, nos EUA e Japão, mas sem sucesso. Apenas na década de 70 ocorreram grandes progressos, com a utilização de culturas para a produção de pigmentos, suplementos alimentares e vitaminas para a indústria farmacêutica (Soeder, 1986).

Ainda nessa década, com as duas crises petrolíferas de 1973 e 1979, o Departamento de Energia dos EUA iniciou, em 1978, um programa de investigação do potencial de microalgas para a produção de biocombustível em campos abertos. O primeiro passo

para explorar tal potencialidade foi dado, em 1978, pelo *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) e pelo Departamento Americano de Energia através da criação de um programa para desenvolver biodiesel a partir de microalgas, cultivadas em tanques (sistema aberto). O programa ficou conhecido como *Aquatic Species Program*. Contudo, o programa foi abandonado em 1996, devido à falta de financiamento, sem atingir o objectivo para o qual foi criado (Sheehan, 1998).

Mais recentemente, com o aumento do preço dos combustíveis fósseis e os receios sobre a falta de abastecimento de matérias-primas energéticas, o interesse por esta tecnologia renasceu, com diversas empresas (incluindo grandes petrolíferas) a levarem a cabo programas de desenvolvimento da produção de microalgas. Estes trabalhos focam-se no desenvolvimento de aplicações industriais e ambientais para microalgas, nomeadamente a produção de biodiesel, biohidrogénio, e mitigação de CO₂. Estes estudos têm também indicado que as microalgas podem ser utilizadas para a remoção de nutrientes e metais pesados em efluentes (Sawayama *et al.*, 1995).

As microalgas poderão, em breve, adquirir um papel fundamental na indústria, por exemplo, na fixação de CO₂ proveniente da queima de combustíveis fósseis, (a produção de 100 t de biomassa fixa aproximadamente 183 t de dióxido de carbono). Este CO₂ poderá ser adquirido gratuitamente e utilizado no crescimento das microalgas (Chisti, 2007).

Com a introdução dos créditos de carbono, as empresas poderão ser incentivadas a fornecer gratuitamente o CO₂ fóssil para obter créditos. Este factor poderá melhorar a economia de produção microalgal. Outros factores de valorização passam pelo aproveitamento da biomassa microalgal e subprodutos resultantes de alguns processos de extracção.

Actualmente, as fontes mais rentáveis de aproveitamento das algas são as indústrias alimentares, farmacêuticas e de cosméticos. Seguem-se alguns exemplos (Spolaore *et al.*, 2006; Gouveia *et al.*, 2010):

- Algas macroscópicas têm propriedades altamente nutritivas. Possuem vitaminas A, B1, B2, B6 e C, e são ricas em potássio, ferro, cálcio e magnésio;
- Suplementes nutritivos ricos em microalgas como a *Spirulina*, *Chlorella* (vitamina C) e *Dunaliella* (β -caroteno);
- Os pigmentos β -caroteno e astaxantina, produzidos a partir da *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*, respectivamente, substituem substâncias químicas e agentes corantes;
- A alga *Chondrus crispus* produz uma substância utilizada como estabilizadora na produção de lacticínios.

O objectivo de produção de biodiesel a partir de microalgas ricas em lípidos é visto por alguns autores como inviável, devido ao seu elevado custo, comprometendo a industrialização do processo. Acredita-se, no entanto, que o objectivo será alcançado mediante o esforço na selecção das espécies de microalgas com elevado teor lipídico, na compreensão da sua fisiologia e na melhoria da tecnologia de cultura de microalgas (Dimitrov, 2007).

1.3.3. Crescimento celular e parâmetros que o caracterizam

O crescimento celular pode ser entendido como o aumento ordenado de todos os componentes químicos celulares. Durante o crescimento equilibrado (quando os microrganismos se encontram completamente adaptados e inseridos num meio adequado), a duplicação da biomassa é acompanhada da duplicação de todas as outras propriedades mensuráveis (proteína, DNA, RNA, entre outras moléculas orgânicas). De forma mais rápida e com menores custos, o crescimento é, normalmente, quantificado em termos de massa ou número de células.

- Análise cinética das reacções biológicas

Na análise cinética das reacções biológicas é útil quantificar taxas e quocientes metabólicos pertinentes para proporcionar uma análise rigorosa da remoção de nutrientes. As taxas volumétricas de formação e consumo, com dimensões $ML^{-3}T^{-1}$, bem como as taxas específicas, com dimensão T^{-1} , são as mais utilizadas. As primeiras

são expressas por massa formada ou consumida por unidade de tempo e de volume de líquido no bioreactor, enquanto as segundas se referem a uma massa formada ou consumida por massa de biomassa total presente no reactor, por unidade de tempo (Fonseca e Teixeira, 2007).

- **Tempo de duplicação**

O tempo de duplicação (t_d), ou tempo de geração, permite-nos calcular o tempo necessário para a duplicação da cultura. É calculado através da divisão da constante $\ln 2$ pela taxa específica de crescimento μ .

- **Taxas volumétricas**

Na presente dissertação calcularam-se as seguintes taxas volumétricas: TVSST (taxa volumétrica de formação de biomassa), TVN (taxa volumétrica de consumo de azoto) e TVP (taxa volumétrica de consumo de fósforo). A equação 1.1 permite o cálculo de uma taxa volumétrica (Fonseca e Teixeira, 2007).

$$r = m \times v^{-1} \times t^{-1} \quad (1.1)$$

Em que,

r – Taxa volumétrica ($\text{mg.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$);

m – Massa formada ou consumida (mg);

v – Volume do reactor (l);

t – Tempo de ensaio (d).

- **Taxas específicas de consumo de substrato**

As taxas específicas de crescimento e de consumo de substrato, que foram calculadas através da equação 1.2, representam o substrato consumido por biomassa total no reactor por tempo decorrido.

$$q = m_s \times m_b^{-1} \times t^{-1} \quad (1.2)$$

Em que,

q – Taxa específica de crescimento ou de consumo de substrato (d^{-1});

m_s – Massa de biomassa formada ou do substrato consumido (mg);

m_b – Massa de biomassa final no reactor (mg);

t – Tempo de ensaio (d).

- **Quociente metabólico de consumo de nutrientes por unidade de biomassa formada**

O quociente metabólico de consumo de azoto ou fósforo por unidade de biomassa formada permite determinar o consumo de substrato necessário para se obter uma unidade de massa de biomassa. Este cálculo é efectuado através da equação 1.3.

$$q_s = \frac{TVS_t}{TVb_t} \quad (1.3)$$

Em que,

q_s – Quociente metabólico de consumo de substrato;

S_t – Unidade de substrato consumido no tempo t (mg S. d^{-1});

b_t – Unidade de biomassa formada no tempo t (mg. d^{-1}).

- **Taxa de remoção de nutrientes**

Através da equação 1.4. é possível elaborar um gráfico que acompanha a evolução das proporções de remoção dos nutrientes ao longo do tempo de ensaio.

$$\eta = \left(1 - \frac{C_f}{C_i} \right) \times 100 \quad (1.4)$$

Em que,

η - Taxa de remoção de um nutriente (%);

C_i – Concentração inicial do nutriente (mg.l^{-1});

C_f – Concentração final do nutriente (mg.l^{-1}).

- Taxa específica de crescimento

As taxas específicas de crescimento são normalmente representadas por q , com excepção da taxa específica de crescimento, que é representada pelo símbolo μ . Esta taxa representa a taxa de formação de biomassa por unidade de biomassa existente no bioreactor e por unidade de tempo (Fonseca e Teixeira, 2007).

O crescimento equilibrado apresenta, normalmente, uma cinética equivalente a uma reacção de primeira ordem igual à que é apresentada na equação 1.5:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \times X \quad (1.5)$$

Em que,

dX/dt – Variação da concentração de biomassa em ordem ao tempo (mg.d^{-1});

X – Concentração de biomassa (mg.l^{-1});

μ - Taxa específica de crescimento (d^{-1});

t – Tempo de ensaio (d).

Na fase de crescimento exponencial, a equação 1.5 pode ser integrada entre X_0 e X_t , no período de ensaio em que dura a fase de crescimento exponencial. Se se considerar que a fase de crescimento exponencial se inicia no tempo t_0 e termina no tempo t , obtém-se a equação 1.6.:

$$\ln X_t = \ln X_0 + \mu(t - t_0) \quad (1.6.)$$

Em que,

X_t – Concentração de biomassa no tempo de ensaio t (mg.l^{-1});

X_0 – Concentração de biomassa no tempo de ensaio t (mg.l^{-1});

μ - Taxa específica de crescimento (d^{-1});

t – Tempo de ensaio (d).

A equação 1.6 corresponde à linearização da equação 1.5 e apresenta como declive a taxa específica de crescimento. Na Figura 1.2 apresenta-se o aspecto gráfico da equação 1.6.

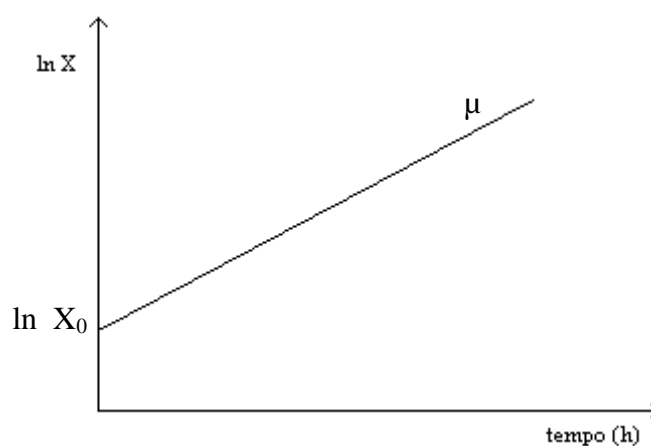


Figura 1.2. – Regressão linear da curva de crescimento na fase de crescimento exponencial

- Cinética de crescimento em cultura descontínua

Considere-se um meio de cultura líquido com uma fonte de energia adequada, os nutrientes necessários, condições químicas e físicas favoráveis em sistema fechado (excepto a troca de gases). Se nele inocularmos uma população de organismos e seguirmos o seu crescimento ao longo do tempo conseguimos obter uma curva (Figura 1.1.) que mostra as várias fases características do crescimento de populações microbianas (Richmond, 2004).

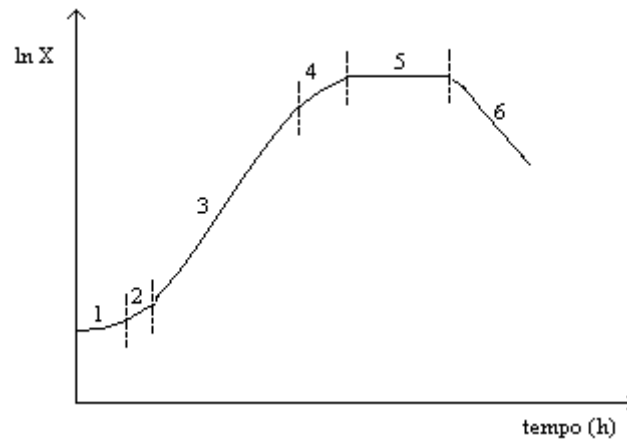


Figura 1.1. – Variação da biomassa numa cultura descontínua (Adaptado de FAO, 2011)

1. **Fase de adaptação (Fase Lag)** ($\mu = \mu_d$, em que μ_d representa a taxa de morte): trata-se de um período de adaptação das células extraídas de uma cultura em fase exponencial ou estacionária para um meio fresco; esta fase é extensa na presença de tóxicos, de nutrientes dificilmente metabolizáveis ou se o inóculo for de reduzida dimensão ou inadequado.
2. **Fase de aceleração do crescimento** ($\mu < \mu_{máx}$): trata-se de um período onde as células já estão adaptadas e começam a multiplicar-se; a taxa específica de crescimento é inferior ao valor máximo.
3. **Fase de crescimento exponencial** ($\mu = \mu_{máx}$): fase de crescimento acelerado onde o valor da taxa específica de crescimento se mantém constante, atingindo o seu valor máximo.
4. **Fase de desaceleração do crescimento** ($\mu < \mu_{máx}$): nesta fase a concentração de um (ou mais) nutriente(s), tornar-se-á limitante, com o consequente decréscimo da taxa específica de crescimento.
5. **Fase estacionária** – As populações raramente conseguem manter um crescimento exponencial a altas velocidades durante um largo período de tempo, visto que o crescimento está limitado pelo esgotamento dos nutrientes ou pela acumulação de

produtos inibitórios do metabolismo. Como consequência a velocidade de crescimento diminui e iguala a taxa de morte ($\mu = \mu_d$). A população de microrganismos mantém, durante algum tempo, uma concentração aproximadamente constante de biomassa à custa da utilização de reservas internas de nutrientes ou dos nutrientes que são libertados para o meio devido à lise de outras células.

- 6. Fase de morte** – A morte resulta do esgotamento de nutrientes da cultura de microrganismos. A cinética de morte é também equivalente a uma reacção de primeira ordem.

1.3.4. Eficiência fotossintética

As microalgas são organismos fotossintéticos, isto é, necessitam da energia luminosa para converter o CO_2 em energia química contida nas moléculas biológicas. A luz utilizada situa-se na gama de 400 a 700 nm do espectro electromagnético e é designada por radiação fotossintética activa (ou PAR, do inglês *Photosynthetic Active Radiation*) (Grima *et al.*, 1999).

A PAR corresponde a uma fracção da energia fornecida pelo sol ($\approx 45\%$) e depende da latitude considerada, da hora do dia e da altura do ano e do clima. De maneira simplificada, podemos representar a fotossíntese pela equação química 1.7, onde $h\nu$ é a energia de um fóton da região PAR (Salisbury *et al.*, 1985):



Relativamente à fotossíntese, é possível calcular o rendimento bioenergético de uma dada cultura de microalgas. O rendimento bioenergético, ψ (%), quantifica a percentagem de energia luminosa que é convertida em energia química e pode ser calculado como sendo o produto de ψ_{kt} (g.KJ^{-1}) pelo poder calorífico da biomassa, PC_b (KJ/g) (equação 1.8).

$$\psi = \psi_{kt} \times PC_b \times 100 \Leftrightarrow PC_b = \frac{\psi}{\psi_{kt} \times 100} \quad (1.8)$$

Multiplicando o PC_b pela quantidade de biomassa produzida, temos a energia total na biomassa E_B (KJ). Esta energia está dependente da energia PAR, E_{PAR} (KJ), e da eficiência do processo, Q (%). E_{PAR} é a quantidade de energia luminosa necessária ($1/\psi_{kt}$) para produzir uma determinada quantidade de biomassa. Desta forma, é possível efectuar-se o balanço energético através da seguinte relação:

$$E_B = E_{PAR} \times Q \quad (1.9)$$

Esta relação é importante, pois permite avaliar a quantidade de energia luminosa que permanece no produto final. A eficiência fotossintética tem um valor máximo teórico (Q_{teo}) de $\approx 27\%$ (Carlsson *et al.*, 2007). O cálculo desse máximo pode ser feito através da equação 1.7: para se produzir uma mole de glucose ($C_6H_{12}O_6$), por fotossíntese, é necessária uma quantidade de energia de 2870 KJ (Mathews *et al.*, 2000).

A energia média de uma mole de fotões PAR (a 550nm) é calculada pela Lei de Planck e é igual a 216,8KJ/mole.

A eficiência fotossintética (Q) de uma dada cultura de microalgas depende de factores biológicos ($F_{biológico}$) como a duração do fotoperíodo, a temperatura, a disponibilidade dos nutrientes, a densidade celular, entre outros factores, e de factores tecnológicos ($F_{tecnológico}$) como a transparência dos materiais, a orientação da cultura em relação ao sol, a eficiência na recolha, a secagem da biomassa e a extracção e conversão do óleo em biodiesel, caso seja esta a fileira energética que se pretende implementar. Assim:

$$Q = Q_{teo} \times (F_{biológico}) \times (F_{tecnológico}) \quad (1.10)$$

As eficiências fotossintéticas medidas em culturas de microalgas raramente excedem os 20% (por exemplo, 20% para *Chlorella sp.* e 21,6% para *Phaeodactylum tricornutum*). Contudo, os valores mais correntes em culturas iluminadas naturalmente rondam os 6% (Kok, 1952; Tamiya, 1957; Fernandez *et al.*, 1998).

1.3.5. Géneros e espécies de microalgas utilizados em Bioenergia e sua importância

Muitos autores classificam as algas em cinco grandes grupos (filos ou divisões) que se distinguem essencialmente pela coloração e pela natureza das substâncias de reserva (Guimarães *et al.*, 2009):

- Divisão *Cyanophyta* ou *Cyanobacteria*;
- Divisão *Clorophyta*;
- Divisão *Euglenophyta*;
- Divisão *Rodophyta*;
- Divisão *Cromophyta*.

A espécie utilizada nos ensaios realizados no presente trabalho foi a *Chlorella vulgaris*. É uma microalga unicelular de água doce ou meios estuarinos, pertencente à divisão *Clorophyta*, ordem *Chlorococcales* e família *Oocystaceae*. Apresenta forma de vida unicelular ou colonial, e pode acumular pigmentos como clorofila *a* e *b*, β -caroteno e xantofilas. A sua forma de reserva de carbono intracelular é o amido. Algumas espécies de microalgas podem acumular lípidos, sob condições ambientais adversas. Este fenómeno de acumulação está relacionado com o *stress* nutritivo (falta de azoto ou fósforo). No entanto, é um processo difícil de replicar, de forma consistente, em laboratório (Klok, 2010).

As microalgas, como qualquer fonte de matéria-prima energética, apresentam vantagens e desvantagens (Becker, 1994; Chisti, 2007). Algumas das principais desvantagens são as seguintes:

- Baixas densidades celulares;
- Pequena dimensão celular;
- A colheita implica elevados custos;
- Baixo rendimento ao ar livre;
- Vários problemas na utilização de bioreactores;
- Foto-inibição e evaporação do meio quando exposto ao ar livre.

Algumas das principais vantagens são as seguintes:

- A produção é permanente ao longo do ano;
- Permite a utilização de terrenos marginais;
- Não compete com as culturas alimentares;
- Permite a utilização de águas impróprias para a agricultura (águas residuais, águas salobras);
- O *scale-up* é relativamente simples;
- Permite o aproveitamento de nutrientes e gases actualmente em excesso nas sociedades industrializadas. A taxa de crescimento elevada das microalgas torna possível satisfazer a procura de biocombustíveis utilizando uma porção de terreno e recursos inferior às culturas energéticas tradicionais.

O potencial das microalgas para produção de biocombustível é grande. Algumas algas produzem amido (que pode ser transformado em bioetanol), algumas poderão produzir hidrogénio e outras têm elevados teores de lípidos que podem ser utilizadas na produção de biodiesel (Sheehan, 1998; Carlsson *et al.*, 2007).

As microalgas são uma excelente fonte de lípidos devido ao facto do seu conteúdo em óleo poder ultrapassar 80% do seu peso total (peso seco), embora os níveis mais comuns estejam entre os 20% e os 50% (Chisti, 2007). Esse teor pode aumentar em algumas espécies de microalgas se as condições de cultura forem modificadas, como por exemplo, reduzindo a concentração dos elementos químicos necessários para o crescimento e divisão das células (azoto, fósforo, silício). Deste modo o teor em lípidos pode aumentar até duas vezes (Illman *et al.*, 2000).

Actualmente, já se conhecem as taxas de produção de lípidos de várias espécies de microalgas. No Quadro 1.1. são apresentados os conteúdos em lípidos de alguns géneros e espécies de microalgas.

Quadro 1.1. Conteúdo em óleo de alguns géneros e espécies de microalgas (Chisti, 2007; Gouveia e Oliveira, 2009)

Género/Espécie	Conteúdo em óleo (% peso seco)
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75
<i>Chlamydomonas sp.</i>	25
<i>Chlorella vulgaris</i>	14-40/56
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16–37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25–33
<i>Nannochloris sp.</i>	20–35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31–68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35–54/65
<i>Nitzschia sp.</i>	45–47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20–30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50–77
<i>Spirulina maxima</i>	4 - 9
<i>Tetraselmis sueica</i>	15–23

Num dos trabalhos de Chisti (2007) é calculado o espaço necessário para a instalação de culturas que alimentem 50% de todos os transportes dos EUA. Os valores referentes às microalgas foram obtidos experimentalmente em reactores. Segundo os valores apresentados neste estudo (Quadro 1.2.), as culturas de microalgas são potenciais candidatos a fornecer todo o biodiesel do território americano.

Quadro 1.2. Produção e espaço de instalação de várias culturas (Chisti, 2007)

Fonte	Óleo (L/ha)	Mha
Milho	172	1540
Soja	446	594
Canola	1190	223
<i>Jatropha</i>	1892	140
Côco	2689	99
Óleo de Palma	5950	45
Microalgas a)	136900	2
Microalgas b)	58700	4,5

a) 70% em óleo

b) 30% em óleo

É importante também referir, ainda que de modo ligeiro, os principais processos de recolha de microalgas e os processos de extracção de óleos.

Os métodos mais utilizados para a recolha da biomassa algal são os seguintes (Borodyanski e Konstantinov, 2002; Bosma, 2006):

- Centrifugação;
- Floculação;
- Ultrasons.

Existem vários processos de extracção que normalmente são precedidos por uma fase de esmagamento mecânico para facilitar a extracção. Estes processos são os seguintes (Richmond, 2004; Li *et al.*, 2008):

- Solventes orgânicos (extracção com solvente como o n-hexano);
- Via enzimática (degradação da parede celular por via enzimática);
- Prensagem (por vezes utilizado em conjunto com solventes orgânicos);
- Choque osmótico (uma súbita redução da pressão osmótica provoca a rupturas das células);
- Fluidos super-críticos (métodos semelhante à extracção por solvente, mas utilizando fluidos em situação super-crítica);
- Ultrasons (utilizados em conjunto com muitos processos para acelerar o processo de ruptura e extracção do conteúdo celular).

1.3.6. Meios de cultura

O crescimento fotossintético requer luz, dióxido de carbono, água e sais inorgânicos. A temperatura aconselhada, para maximizar o crescimento, situa-se entre os 20 e os 30°C. De forma a minimizar os custos associados ao fornecimento de luz à cultura, o crescimento deve depender da luz solar, apesar das variações diárias e sazonais.

A fonte luminosa pode ser a luz solar ou uma fonte artificial, o dióxido de carbono e oxigénio são introduzidos através de bombagem de ar ou gases. A Figura 1.3. apresenta um fluxograma representativo da cadeia de processos no cultivo das microalgas.

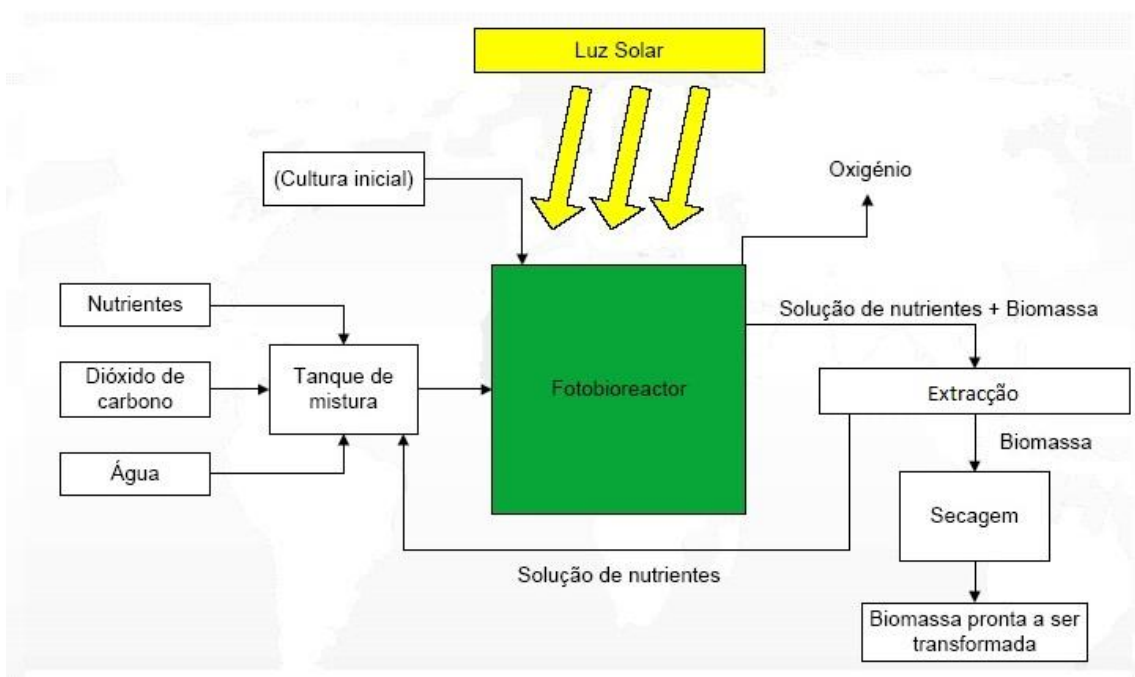


Figura 1.3.- Cadeia de processos no cultivo de microalgas (Adaptado de FAO, 2011)

Os meios de cultura podem ser:

- Completamente sintéticos;
- Águas naturais enriquecidas com minerais (água marinha suplementada com fertilizantes ricos em nitrato e fosfato são muitas vezes utilizados para o crescimento de microalgas marinhas);
- Águas residuais.

Apesar de existirem vários meios de cultura com constituições distintas, na escolha de qualquer um destes deve ter-se em consideração os seguintes aspectos (Vonshak, 1986):

- Concentração salina (deve depender do *habitat* original da microalga);
- Fonte de carbono. Visto que 50% da biomassa é constituída por carbono, uma fonte constante é de uma importância vital para o crescimento. O carbono pode ser fornecido como CO₂ gasoso;
- Fonte de azoto. É essencial escolher uma fonte adequada e económica de azoto. Nitrato e azoto amoniacal são dos mais utilizados dependendo da espécie e do seu pH óptimo;
- No meio de cultura é importante incluir os restantes elementos essenciais: Potássio, Magnésio, Sódio, Sulfato e Fósforo (fosfato);
- O pH óptimo do meio;
- Existência de elementos vestigiais (cobalto, zinco, cobre, ferro etc.). É usado o EDTA para ajudar na solubilização de alguns destes elementos;
- Adição de componentes orgânicos e substâncias que promovem o crescimento (vitaminas, hormonas, etc.);
- Baixo custo e alta disponibilidade.

Um dos factores importantes nos meios de cultura é a razão N:P. Esta razão pode determinar não só o potencial de produtividade como a dominância de uma dada espécie. É através desta razão que se chega ao conceito de nutriente limitante.

A razão nutritiva óptima é normalmente dada pela razão de Redfield, a qual é a seguinte: 106C:16N:1P. Estas proporções são consideradas óptimas para o crescimento da generalidade microalgas. A razão N:P óptima de 16 para 1 dá um ponto de partida para posteriores estudos de limitações nutricionais. Razões inferiores a esta indicam uma limitação de azoto e razões superiores indicam uma limitação de fósforo. As mudanças das concentrações de nutrientes provocam uma alteração no crescimento normal destes microrganismos, sendo consideradas como um dos factores importantes na maximização do crescimento.

A produtividade de culturas foto-autotróficas (em condições óptimas de nutrição) está limitada principalmente pela disponibilidade da luz e pelas dificuldades da conversão energética, devido à má distribuição da luz no interior das culturas. Na superfície, a

intensidade luminosa é alta, mas a absorção e reflexão resultam na diminuição da intensidade luminosa e dificuldades de a obter dentro das culturas. A eficiência fotossintética é boa à superfície, mas em profundidade é afectada pela fraca penetração da luz. A maioria dos estudos de produção é feita em reactores com fonte de luz natural (Eriksen, 2008). Nestes reactores, a limitação que advém da má distribuição luminosa pode ser minimizada através de uma boa mistura da cultura.

1.3.7. Métodos de cultivo

Existem dois tipos de estratégia de cultura de microalgas: as culturas ditas “abertas” (em tanques ou lagoas a “céu aberto”) e as culturas ditas “fechadas” (em reactores) (Borowitzka, 1999).

Um fotobioreactor é um sistema usado para a cultura de células fotossintéticas, como as microalgas, que utiliza uma fonte luminosa natural ou incorpora uma fonte luminosa artificial.

1.3.7.1. Sistemas “abertos” de cultura de microalgas

Este tipo de sistema consiste em tanques abertos ao ar livre que utilizam a luz do Sol e nos quais a cultura de microalgas é mantida em circulação por pás mecânicas até atingir a densidade pretendida.

Culturas ao ar livre podem ser classificadas em locais naturais (lagos ou lagoas) ou locais artificiais (lagoas *raceway*, lagos circulares ou tanques). Actualmente, a opção mais utilizada passa pelas lagoas *raceway*.

Uma lagoa *raceway*, representada na Figura 1.4., é constituída por um canal fechado de circulação que tem, tipicamente, uma profundidade de 0,3 m. A mistura e circulação da cultura de microalgas estão a cargo de um rotor. Os canais são construídos em cimento ou terra compactada e podem ser revestidas com material de cor clara para melhorar a reflexão da luz.

Durante o dia, o meio de cultura é introduzido continuamente à frente do rotor onde a corrente se inicia. As microalgas são retiradas atrás do rotor, ao completar o trajecto. O rotor é mantido sempre em movimento para evitar a sedimentação (Chisti, 2007; Ugwu *et al.*, 2008).

Estes sistemas de cultura requerem grandes áreas de cultivo e não permitem um controlo adequado das condições de cultura (temperatura, luminosidade, concentrações gasosas, entre outros factores), tornando-se impossível manter uma monocultura. Contudo, o crescimento neste tipo de tanques não requer dispendiosos processos de esterilização ou limpeza do espaço de cultura.

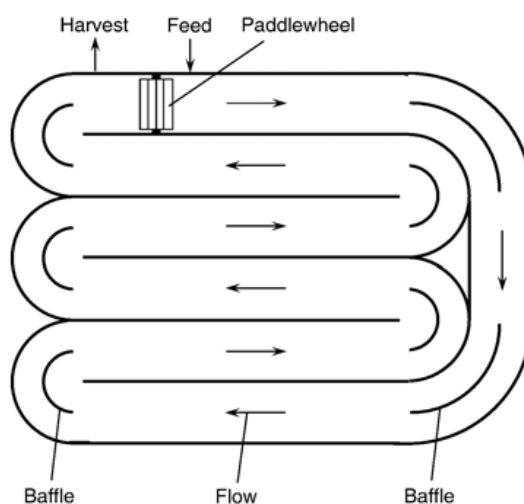


Figura 1.4. – Diagrama de uma lagoa *raceway* (Chisti, 2007)

1.3.7.2. Sistemas “fechados” de cultura de microalgas

Este modelo de cultura apresenta muitas vantagens quando comparado com as culturas abertas, como sejam o maior controlo sobre as condições de cultura, possibilidade de cultivar diferentes espécies de microalgas, reduzido risco de contaminação, baixas perdas de água, ou ainda as reduzidas perdas de CO₂ introduzido que, no seu conjunto, se reflectem numa produtividade superior por unidade de área.

Embora seja possível cultivar microalgas num reactor ao longo de todo o ano, a temperatura e a luz disponível (se natural) limitam a sua utilização ou obrigam ao recurso a sistemas mais ou menos sofisticados de arrefecimento e de iluminação artificial, com óbvio impacto no custo operacional. Os reactores podem ser arrefecidos por aspersão de água nas superfícies expostas à luz solar ou por passagem da cultura em banhos mais frescos (Fernandez *et al.*, 1998; Hall *et al.*, 2003).

A agitação da cultura é importante de modo a garantir a iluminação uniforme de todas as células em suspensão. Nos reactores essa é efectuada mecanicamente, através de bombas, pás rotativas, ou através da injeção de ar e CO₂.

Os parâmetros que afectam a configuração do reactor são: a iluminação, a relação entre a superfície iluminada e o volume de cultura (uma vez que a eficiência fotossintética e produtividade de biomassa dependem directamente da luz), a troca de gases com o meio de cultura (fornecimento de CO₂ e remoção de oxigénio) e área instalada. Em consequência, podemos encontrar vários tipos de fotobioreactores fechados, com diferentes tipos de geometrias, dimensões, materiais e princípios de funcionamento (Carvalho *et al.*, 2006).

A Figura 1.5. apresenta os diferentes tipos de concepção de reactor que podem ser encontrados actualmente.

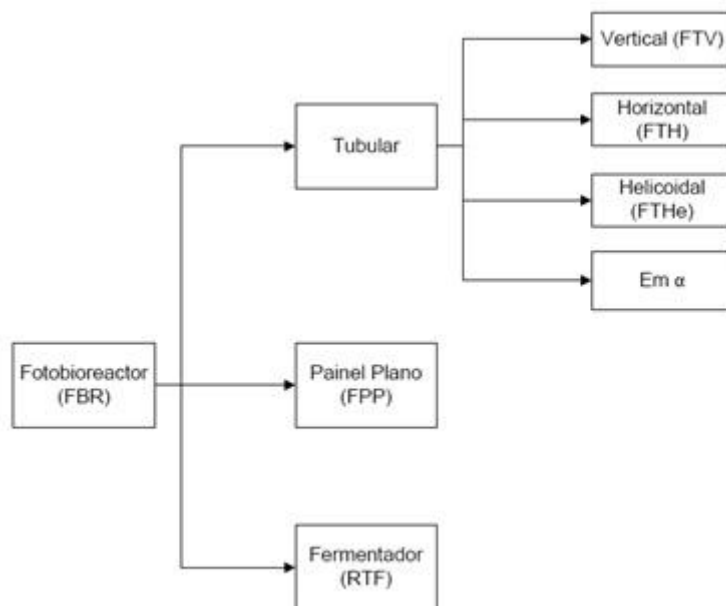


Figura 1.5. – Diferentes fotobioreactores existentes

Os reactores tubulares são os sistemas mais utilizados, sendo basicamente constituídos por tubos dispostos em várias orientações possíveis. Deste modo, existem fotobioreactores tubulares verticais, horizontais, helicoidais ou ainda em alfa. Os fotobioreactores tubulares são construídos com materiais transparentes rígidos, geralmente em acrílico. No entanto, também podem ser constituídos por grandes sacos de polietileno de baixa densidade. Estes últimos, embora mais frágeis, são mais baratos, sendo geralmente utilizados na produção de inóculo para volumes superiores de cultura ou para produção de microalgas para alimentar bivalves e crustáceos em aquacultura (Grima *et al.*, 1999; Ugwu *et al.*, 2008).

O maior problema dos fotobioreactores tubulares é a eficiência luminosa, que é prejudicada pela curvatura da superfície dos tubos. Isso faz com que parte da luz solar incidente à superfície do tubo seja reflectida, não sendo aproveitada para o crescimento da biomassa.

Os fotobioreactores tubulares horizontais permitem um melhor aproveitamento da luz (relativamente à orientação vertical) necessitando, no entanto, de uma grande área

instalada. A disposição horizontal dos tubos também levanta dificuldades relativamente a introdução de CO_2 e à remoção do O_2 . A movimentação da cultura é realizada por bombas que a impulsionam através da tubagem. Este sistema é utilizado com sucesso desde 1999, na Alemanha (em Klötze), na produção de *Chlorella* como suplemento alimentar (Algomed, 2008).

Nos fotobioreactores tubulares helicoidais a disposição dos tubos garante uma utilização da luz solar mais eficiente, sem no entanto necessitar de muita área de instalação. Estes fotobioreactores são normalmente construídos em mangueira de polietileno de pequeno diâmetro (30 mm) enrolado em torno de um eixo vertical, os quais podem adoptar uma geometria cilíndrica ou cónica. Todavia, tal como os fotobioreactores horizontais, a troca gasosa deverá ser feita através de um permutador de gases, o que dificulta a tarefa de aumento de escala (*scale-up*) deste tipos de reactores.

Os fotobioreactores tubulares verticais são menos eficientes relativamente à utilização da luz solar. Contudo, estes reactores apresentam uma relação favorável de volume de cultura relativamente à área instalada. Outra vantagem reside na simplicidade do sistema de agitação: este é normalmente realizado através da injeção de ar na parte inferior da coluna. Desta forma, é possível homogeneizar o meio de cultura que contém as microalgas, fornecendo simultaneamente o CO_2 necessário à fotossíntese e removendo de forma eficiente o O_2 resultante desta. A questão da eficiência luminosa é por vezes resolvida recorrendo à iluminação artificial externa ou colocada no interior do mesmo.

Os fotobioreactores tubulares em alfa devem o seu nome à disposição dos seus tubos e reúnem por isso algumas das vantagens dos reactores horizontais e verticais, como seja a eficiência luminosa, as trocas gasosas e uma boa relação volume/área instalada. Este reactor é constituído por tubos verticais paralelos cujos topos (inferior de um e superior de outro) estão unidos por tubos oblíquos (cerca de 45°). A cultura é mantida em movimento por sistemas de borbulhamento de ar do tipo *airlift* que arrastam a

cultura para os topos dos tubos verticais onde se escoia pelos tubos oblíquos até à base do outro tubo vertical. A sua complexidade dificulta o seu *scale-up*.

Os reactores de painel plano são fotobioreactores constituídos por finos painéis de vidro, acrílico ou PVC entre os quais circula a cultura de microalgas, sendo especialmente concebidos para aproveitarem ao máximo a luz incidente (Barbosa, 2003).

A circulação da cultura é garantida por borbulhamento de ar na base do painel ou por bombagem. Este sistema de cultura, a semelhança dos restantes reactores iluminados pela luz solar, deve dispor de sistemas de refrigeração seja por aspersão de água, seja pela presença de um painel duplo através do qual circula o líquido de refrigeração. A relação entre o volume de cultura e a área instalada não é, todavia, favorável para este sistema, sendo a sua construção relativamente complexa (Doucha e Livansky, 2006; Eriksen, 2008; Ugwu *et al.*, 2008).

Os reactores do tipo fermentador são sistemas de cultura fechados, geralmente iluminados artificialmente e agitados mecanicamente, usados para produção de microalgas à escala laboratorial (Li *et al.*, 2003). Estes reactores permitem o controlo quase total dos parâmetros de cultura (luz, temperatura, gases, agitação, pH, etc.), mas dada a sua complexidade são sistemas caros.

1.4. A importância das microalgas na depuração de águas residuais

1.4.1. O azoto e o fósforo

O fósforo pode ser encontrado dissolvido na água sob a forma de fosfato (PO_4), a única forma que pode ser assimilada pelos seres vivos, ou na forma suspensa, incorporado nas estruturas celulares (fósforo orgânico). É um elemento com um ciclo geológico simples e que muitas vezes é um nutriente limitante para os ecossistemas devido à sua fácil imobilização nos solos ou nos sedimentos.

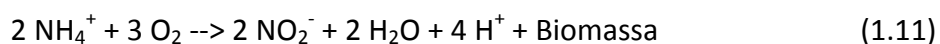
A seguir ao carbono, o azoto é o nutriente que mais contribui para a produção de biomassa. A resposta típica à falta de azoto é a descoloração das células microalgais (diminuição das clorofilas e aumento dos carotenóides) e acumulação de compostos como polissacarídeos e hidrocarbonetos.

As principais formas de azoto que podemos encontrar nas águas são o azoto Kjeldahl, o azoto amoniacal (NH_4^+), os nitritos (NO_2^-) e os nitratos (NO_3^-). No azoto Kjeldahl e no azoto amoniacal, o azoto encontra-se na sua forma mais reduzida. São estes compostos que necessitam de maior quantidade de oxigénio (fornecido pelo meio aquático) para se oxidarem, ou seja, passarem a uma forma mais estável (os nitratos).

Os fenómenos de oxidação e redução das diferentes formas de azoto são conhecidos como nitrificação e desnitrificação biológica, respectivamente.

A nitrificação biológica é o fenómeno segundo o qual as formas de azoto orgânico e amoniacal, presentes na água residual, são oxidadas a nitratos. O processo de nitrificação ocorre em dois passos (equações químicas 1.11 e 1.12):

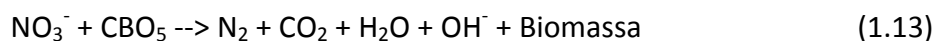
- a) Nitritação – oxidação do azoto amoniacal a nitritos, fundamentalmente sob a acção de bactérias do género *Nitrosomonas*.



- b) Nitratação – oxidação dos nitritos a nitratos, fundamentalmente sob a acção de bactérias dos géneros *Nitrobacter* e *Nitrospira*.



A desnitrificação biológica corresponde à redução dos nitratos até à forma de azoto molecular. É um processo anóxico promovido por organismos heterotróficos, como é o caso de bactérias do género *Pseudomonas*.



1.4.2. Remoção biológica de nutrientes

A remoção biológica de nutrientes consiste, como o nome indica, na remoção de nutrientes dos efluentes por via biológica. Existem também vias químicas de remoção que não serão discutidas no presente trabalho por estarem fora do seu objectivo.

A remoção biológica de azoto é um processo de dois passos. No passo da nitrificação, o efluente secundário entra no tanque de arejamento onde as bactérias nitrificantes proliferam. Estes microrganismos convertem o azoto amoniacal em nitratos. No segundo passo, as bactérias desnitrificantes facultativas, funcionando em ambiente anóxico, reduzem os nitratos a azoto molecular que se difunde para a atmosfera.

A remoção de fósforo é tipicamente feita por precipitação química (coagulação-floculação), utilizando substâncias como o ferro ou alumínio. Este método, apesar de eficaz, é economicamente dispendioso e causa o excesso de produção de lamas com concentrações elevadas do metal utilizado na coagulação-floculação. A via biológica consiste na utilização de bactérias acumuladoras de fosfatos. Estas bactérias conseguem absorver até 20% do seu próprio peso em fosfatos e são depois valorizadas como adubo. No entanto, o custo e a baixa fiabilidade deste processo não permitem a sua maior utilização (Azevedo, 2003).

1.4.3. O papel das microalgas na remoção de nutrientes

Nos sistemas de tratamento de águas residuais que recorrem a microalgas, as populações de microrganismos são constituídas por populações mistas de microalgas, bactérias e zooplâncton (predadores). A relação entre as microalgas e as bactérias é simbiótica no sentido em que o oxigénio, proveniente da fotossíntese, é utilizado pelas bactérias para biodegradação aeróbia dos compostos orgânicos. Neste processo, o carbono orgânico é transformado em CO_2 que depois vai ser assimilado pelas microalgas (IBGE, 2004).

O crescimento das populações de microalgas está dependente da disponibilidade de nutrientes no meio. Estes microrganismos acumulam azoto e fósforo e transformam-

nos em substâncias de reservas que podem ser convertidas em produtos com valor comercial. A grande vantagem está no facto de as microalgas possuírem a capacidade de assimilar os nutrientes solúveis em quantidades maiores do que as necessárias para o seu crescimento imediato. Juntamente com a sua capacidade de absorverem contaminantes, como os metais pesados, as microalgas são microrganismos com um potencial elevado para a depuração de águas residuais (Dinis *et al.*, 2004).

Este conceito começou a ser investigado no fim dos anos 50 (Goluecke *et al.*, 1957). O sistema testado era constituído por uma série de lagoas de estabilização onde eram cultivadas as microalgas. Estas infra-estruturas tiveram utilização à escala piloto na Universidade de Berkeley, na Califórnia (Oswald, 1990; Green *et al.*, 1995a; Oswald, 1995; Green *et al.*, 1995b; Green *et al.*, 1996).

No Quadro 1.3 estão reunidos alguns dos exemplos mundiais da utilização de microalgas na depuração de águas residuais.

Quadro 1.3 – ETARs que utilizam microalgas na depuração de águas residuais (González, 2005)

País	Influente	Microalga	Produtividade (g.m ² .d ⁻¹)
Israel	Doméstico	<i>Scenedesmus, Euglena e Chlorella</i>	44,2
Taiwan	Suicultura	<i>Spirulina e Chlorella</i>	15,0 - 25,0
Índia	Doméstico	<i>Spirulina</i>	10,0 - 12,0
Índia	Melaço	<i>Scenedesmus</i>	15,0 - 20,0
Tailândia	Tapioca	<i>Spirulina</i>	7,0 - 10,0
Singapura	Suicultura	Várias	5,4 - 5,0
E.U.A.	Gado	<i>Chlorella</i>	30
Malásia	Côco	<i>Chlorella</i>	2,7 - 12,8
Brasil	Doméstico	<i>Scenedesmus e Chlorella</i>	10,0 - 27,0

Uma das técnicas mais utilizadas, e promissoras, é a depuração através da imobilização de células vivas. O conceito advém das dificuldades existentes em separar a biomassa do meio líquido, visto a filtração e a centrifugação não serem rentáveis para grandes

volumes de meio de cultura. O objectivo final é a depuração das águas e simultaneamente manter o suporte da biomassa fixo, resolvendo o problema de separação da biomassa do meio líquido. Esta técnica foi introduzida em 1985, com o objectivo de se efectuar o tratamento de águas residuais (De la Noue e Chevalier, 1985; De la Noue *et al.*, 1992; De la Noue De Pauw, 1998).

Estão definidas seis técnicas de imobilização: imobilização covalente, imobilização por afinidade, adsorção, captura em emulsão líquido-líquido, captura em membrana semi-permeável e imobilização em polímeros (Mallick, 2002). Estes tipos de imobilização podem ser considerados passivos, se utilizam a capacidade natural dos organismos de aderirem a determinadas superfícies, ou activo, se forem utilizados agentes floculantes, captura química ou imobilização em matrizes gelatinosas.

1.4.4. Crescimento de microalgas em águas residuais

O trabalho de Singh e Dhar (2007) comparou cinco espécies de microalgas em relação ao seu potencial para remoção de azoto e fósforo de uma água residual após tratamento secundário.

Utilizou um fotoperíodo de 16 h (luz)/8 h (escuro), luminosidade de 3000 lux, temperatura de 28°C e inóculo de 0.1 de densidade óptica (medido a 750 nm). O efluente tinha um pH = 7,15 e uma concentração em NO₃ de 0,57 mg.l⁻¹.

Os resultados obtidos neste estudo encontram-se resumidos no Quadro 1.4.

Quadro 1.4 – Peso seco e percentagem de remoção de NO₃ e P (Singh e Dhar, 2007)

Tempo = 25 dias	Peso seco (mg.l ⁻¹)	% Remoção NO ₃	% Remoção de P
<i>Nosctoc muscorum</i>	865,3	73,8	52,0
<i>Anabaena variabilis</i>	601,8	23,4	62,0
<i>Oscillatoria princeps</i>	471,9	78,6	67,7
<i>Plectonema</i> sp.	687,6	55,2	47,5
<i>Chlorella vulgaris</i>	30,5	53,8	49,6

O autor concluiu que a *Oscillatoria princeps* foi a microalga que obteve taxas de remoção mais elevadas. No entanto, o seu peso seco, no final do ensaio, foi o segundo mais baixo dos pesos secos determinados para as microalgas estudadas. A microalga que foi mais eficiente na remoção e no crescimento foi a *Nostoc muscorum*.

O trabalho de Shi (2007) apresenta uma técnica inovadora que consiste na imobilização por dupla camada. As microalgas são imobilizadas por adsorção num suporte microporoso, ultrafino e húmido (camada suporte). Por baixo desta camada é colocada uma outra, de tecido fibroso macroporoso (camada origem), que fornece o meio de cultura. Os microrganismos estão assim separados efectivamente do meio de cultura permitindo, no entanto, a difusão de nutrientes.

Os resultados indicam uma remoção de nitratos e fósforo superior a 90% ao longo de nove dias de ensaio. As espécies utilizadas foram a *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus rubescens*.

Ruiz-Marin e Mendoza-Espinosa (2008) colocaram a microalga *Botryococcus braunii* a crescer numa água residual com as características apresentadas no Quadro 1.5.

Quadro 1.5 – Constituição da água residual utilizada no trabalho de Ruiz-Marin e Mendoza-Espinosa (2008)

Parâmetro	Valor analítico
Nitratos	0,9 mg.dm ⁻³
Nitritos	0,14 mg.dm ⁻³
Fosfatos	11,5 mg.dm ⁻³
CQO	49,7 mg O ₂ .dm ⁻³
Condutividade	978 µS.cm ⁻¹
pH	7,6

No final do ensaio registou-se uma taxa de crescimento de 0,13 d⁻¹, e uma produtividade de 12 mg.dm⁻³.d⁻¹. A biomassa extraída apresentava 12,54% de proteínas, 17,85% de lípidos totais e 1,91% de hidrocarbonetos.

Em 2010, Ruiz-Marin *et al.* publicaram de novo na área das microalgas e águas residuais. Neste trabalho utilizaram as espécies *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus* imobilizadas em esferas de alginato calcificado e não imobilizadas. Realça-se que as células imobilizadas acumularam 28% em lípidos, ao fim de 150 h.

Os principais resultados obtidos neste estudo encontram-se resumidos no Quadro 1.6.

Quadro 1.6. Taxas de crescimento e remoção de NH_4 e PO_4 obtidas no trabalho de Ruiz-Marin *et al.* (2010)

	Taxa de crescimento (d^{-1})	Taxa de remoção NH_4 (%)	Taxa de remoção PO_4 (%)
<i>Chlorella vulgaris</i> imobilizada	0,11	80,0	53,3
<i>Scenedesmus obliquus</i> imobilizada	0,157	96,6	55,2
<i>Chlorella vulgaris</i> livre	0,377	60,1	80,3
<i>Scenedesmus obliquus</i> livre	0,401	100,0	83,3

Dos dados experimentais registados é possível concluir que a microalga *Scenedesmus obliquus* é a melhor candidata para testes posteriores. Esta microalga apresentou, sob a forma imobilizada e livre, melhores taxas de crescimento e remoção de nutrientes. As culturas de microalgas apresentaram ambas melhores resultados com crescimento livre. No entanto, uma vez que as taxas de remoção do crescimento imobilizado aproximaram-se das mesmas com crescimento livre, o trabalho futuro poderá aprofundar a imobilização, caso esta técnica apresente vantagens económicas ou tecnológicas.

No Quadro 1.7. são apresentadas taxas específicas de crescimento obtidas por vários autores que cultivaram a microalga *Chlorella vulgaris* em águas residuais tratadas.

Quadro 1.7. Taxas de crescimento e respectivas temperaturas de ensaios de vários autores

Meio	Temperatura	μ (d ⁻¹)	Referência bibliográfica
a)	24°	0,271	Lau <i>et al.</i> (1995)
b)	24°	0,420	Lau <i>et al.</i> (1997)
c)	25°	0,170	Lim <i>et al.</i> (2010)
d)	20°	0,432–1,320	González <i>et al.</i> (2010)

- a) Água residual após tratamento secundário
- b) Água residual após tratamento primário
- c) Água residual após tratamento terciário
- d) Água residual após tratamento secundário biológico

Os resultados do Quadro 1.7. estão em linha com os outros resultados encontrados na bibliografia. O resultado que se destaca é a gama de taxas de crescimento no artigo de González *et al.* (2010).

1.4.5. Efeito da intensidade luminosa e fotoperíodo no crescimento microalgal

As microalgas no ambiente natural estão expostas a uma variedade de condições ambientais. Estas condições sofrem variações segund os dois ciclos: o circadiano (variações de luz e temperatura num ciclo de 24h) e o sazonal (variação anual que está dependente da zona geográfica e climática). A capacidade de adaptação é a chave da resiliência destes organismos. Por vezes as reacções de aclimação incluem mudanças nos fenómenos de formação e degradação dos fotossistemas, em resposta às alterações na qualidade e intensidade da luz. Estes fotossistemas são complexos proteicos (enzimas) que utilizam a energia luminosa para reduzir as moléculas durante a fotossíntese (Richmond, 2004). Estas mudanças permitem equilibrar a produção de adenosina trifosfato (ATP) para evitar o aumento de *stress* celular.

As culturas de microalgas requerem o controlo rigoroso de todos os factores de crescimento: nutrientes, pH, temperatura, concentração de CO₂, O₂, e luz. Para

otimizar o crescimento é necessário compreender o comportamento dos microrganismos sob diferentes condições ambientais.

A fotossíntese pode ser caracterizada como uma reacção redox catalisada pela energia luminosa e que transforma dióxido de carbono e água em glúcidos e oxigénio. Esta reacção está dividida em duas fases, a fase luminosa e a fase escura. A fase luminosa ocorre nas membranas fotossintéticas, onde a energia luminosa é convertida em energia química formando um redutor, NADPH_2 , e ATP. A fase escura ocorre no estroma, onde o NADPH_2 e o ATP são utilizados na redução do CO_2 para glúcidos (Richmond, 2004).

Esta mudança de fase é necessária porque existem estruturas essenciais que só funcionam numa das fases. É este equilíbrio entre fenómenos anabólicos e catabólicos que permite o desenvolvimento das microalgas. Na utilização industrial, a aplicação de um fotoperíodo permite a poupança energética durante as horas da fase escura, pois não seria economicamente viável a manutenção de 24h de luz.

Na zona de baixa radiância (zona limitante), a relação da taxa fotossintética com a intensidade luminosa é linear. Com o aumento da intensidade luminosa, a fotossíntese torna-se mais eficiente, até atingir o valor de saturação. Sob prolongada saturação luminosa, as taxas fotossintéticas têm tendência a diminuir, devido a um fenómeno conhecido como fotoinibição (Bouterfas *et al.*, 2006).

Do ponto de vista abiótico o crescimento depende de três factores principais: luz, temperatura e nutrientes disponíveis. Se considerarmos um meio sem limitações de nutrientes, a eficiência do crescimento microalgal é determinada pela intensidade luminosa e pela temperatura. De entre as variáveis luminosas, o fotoperíodo influencia os ritmos circadianos da fotossíntese, a respiração, a divisão celular e o ritmo de crescimento.

No estudo de Bouterfas *et al.* (2006), foi analisado o efeito da alteração do fotoperíodo e intensidade luminosa nas espécies *Selenastrum minutum*, *Coelastrum microporum*, *Cosmarium subprotumidum*.

No estudo de alteração da intensidade luminosa concluiu-se que a taxa de crescimento aumenta com a intensidade luminosa até atingir a taxa de crescimento máxima que corresponde à intensidade luminosa óptima. A partir deste ponto verificou-se uma saturação luminosa e foi confirmada a existência de fotoinibição nas três espécies. Verifica-se então que a taxa de crescimento máxima corresponde à intensidade luminosa ideal e valores acima ou abaixo deste afectam negativamente o crescimento.

O ensaio de Bouterfas *et al.* (2006), em que se fez variar o fotoperíodo, mostrou que o crescimento máximo se verifica sob radiância constante (24 h). No entanto, a partir das 15 h de radiância a variação no crescimento ficou cada vez mais imperceptível. O autor afirma então que as 9h na ausência de luz são suficientes para a fase escura da fotossíntese.

1.4.6. Efeito da temperatura no crescimento microalgal

A velocidade de uma reacção química está dependente de vários factores (pressão, energia de activação, etc.), entre os quais se encontra a temperatura. Normalmente, um aumento na temperatura é acompanhado por um aumento na velocidade de reacção. A temperatura é uma medida da energia cinética do sistema, logo temperaturas elevadas implicam médias de energia cinética mais elevadas e mais colisões por unidade temporal (Jones e Atkins, 2000).

As reacções metabólicas de todos os seres vivos são regidas por estruturas e compostos que dependem da velocidade das reacções químicas associadas. Para cada conjunto de reacções (processos metabólicos) existe uma temperatura ideal associada. Por norma, a partir da velocidade basal, um aumento na temperatura provoca, respectivamente, uma aceleração dos fenómenos associados (Sadava *et al.*, 2009).

Temperaturas entre 15 e 25°C são aceites como óptimas para o crescimento microalgal e temperaturas inferiores resultam em menor crescimento e menores taxas metabólicas. No entanto, a temperatura ideal específica varia de uma espécie para outra. Enquanto se pode esperar que a taxa fotossintética e absorção de nutrientes sejam mais baixa a temperaturas mais baixas, existirão microalgas aclimatizadas a estas condições que podem atingir taxas de crescimento e remoção elevadas dadas as restantes condições serem ideais. É de notar que em climas húmidos, onde a evaporação é inibida, poderá haver um aquecimento em excesso do meio aquático, o que pode ser nocivo para os microrganismos (Soeder, 1981).

No trabalho de Chinnasamy *et al.*, (2009) foi avaliado o crescimento da espécie *Chlorella vulgaris* sob diferentes condições de temperatura e CO₂. Foram testadas concentrações de CO₂ numa gama de 0.036% (valor normal da atmosfera) a 20% e temperaturas de 30°C, 40°C e 50°C. As maiores concentrações de biomassa foram obtidas com o CO₂ a 6% e uma temperatura de 30°C. Temperaturas mais elevadas resultaram num decréscimo do crescimento. Concluiu-se que a temperatura ideal para o crescimento de *Chlorella vulgaris* é de 30°C. No entanto, para se obter o rendimento mais elevado é necessário saturar a cultura com uma concentração de CO₂ 166 vezes mais elevada que o valor atmosférico.

1.4.7. Objectivos da presente dissertação

O objectivo principal deste trabalho é o estudo da cinética de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual submetida a um tratamento biológico sem remoção de N e P, e sem ser submetida a qualquer tipo de pré-tratamento em laboratório (nomeadamente desinfecção), sob diferentes condições de temperatura e fotoperíodo, simulando as condições típicas de Verão e Inverno observadas ao nível da latitude de Lisboa.

Pretendeu-se também avaliar a taxa de remoção dos nutrientes N e P no decurso do crescimento algal. O interesse deste trabalho reside no facto das microalgas poderem utilizar alguns dos nutrientes presentes nas águas residuais que foram submetidas a um tratamento biológico, em especial o N e o P, e que, na perspectiva do meio receptor, são considerados como compostos químicos indesejáveis devido ao seu potencial de eutrofização dos meios hídricos naturais.

A empresa que explora a ETAR pode aproveitar a capacidade que as microalgas apresentam em consumirem N e P para efectuar a remoção destes nutrientes do efluente tratado, através da actividade fotossintética, e efectuar a valorização da biomassa para fins energéticos, através da venda dessa biomassa ou da sua valorização energética.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho experimental decorreu nos laboratórios do DCTB (Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa). As amostras da água residual foram colhidas na ETAR de Fernão Ferro (Seixal), a qual é explorada pela empresa Simarsul.

2.1. Caracterização da ETAR

A ETAR de Fernão Ferro localiza-se no concelho do Seixal, freguesia de Fernão Ferro, e encontra-se em funcionamento desde 1988. A ETAR está inserida no Subsistema de Fernão Ferro que inclui, além desta infra-estrutura, cerca de 10 km de emissários e condutas elevatórias e duas estações elevatórias. A ETAR tem capacidade para, no ano horizonte de projecto, efectuar o tratamento de $5890 \text{ m}^3.\text{dia}^{-1}$ de águas residuais urbanas, correspondendo a cerca de 32700 habitantes-equivalente. O nível de tratamento instalado é terciário, dispondo de desinfecção do efluente final, estando a ETAR também dotada de um sistema de desodorização e de um sistema de reutilização de água de serviço adequada para uso interno (Simarsul, 2010).

Tendo em vista a melhoria da qualidade do efluente, aumento da capacidade de tratamento, melhoria da operacionalidade e a instalação de uma unidade de desodorização, a ETAR sofreu as seguintes obras de remodelação e ampliação no ano de 2007 (Simarsul, 2010):

- **Tratamento Preliminar** – Execução de novo edifício adaptado aos equipamentos compactos de remoção de gradados, desarenação e desengorduramento e sua compatibilização com as infra-estruturas existentes;
- **Decantação Primária** – Reabilitação do equipamento existente assim como do órgão em si, acrescida da colocação de medição de caudal a montante para efeitos de contabilização do caudal de entrada na ETAR;
- **Valas de Oxidação** – Construção de raiz destes órgãos;
- **Decantadores Secundários** – Reabilitação e construção de nova unidade;
- **Desinfecção** – Construção da unidade de desinfecção final UV;
- **Espessadores de Lamas** – Construção de nova unidade;

- **Digestores** – Construção de uma nova unidade e reabilitação da existente, acrescentando nesta a colocação de cobertura com capacidade de armazenamento;
- **Desidratação de Lamas** – Construção de edifício devidamente desodorizado para esta etapa e aquisição de novo equipamento (centrífugas) para efeitos de substituição de leitos de secagem, os quais se mantêm como recurso alternativo;
- **Armazenamento de Lamas** – Aquisição de silo (capacidade 70m³);
- **Desodorização** – Construção de duas unidades para tratamento de odores (biofiltro).

Após a finalização das obras de remodelação e ampliação, a ETAR de Fernão Ferro possui os seguintes serviços (Simarsul, 2010):

Fase Líquida

- Pré-Tratamento

Consiste na remoção de sólidos grosseiros, areias e gorduras existentes nos efluentes. Os gradados e areias são colocados em contentores e enviados a destino final adequado. As gorduras são enviadas para a fase sólida de tratamento existente na ETAR.

- Tratamento Primário

Trata-se de uma operação de decantação primária onde ocorre a remoção dos sólidos de menor dimensão que ainda subsistem no caudal afluente e são aqui sedimentados.

- Tratamento Secundário

Nesta etapa, a água residual é conduzida para o tratamento secundário assegurado por valas de oxidação, onde ocorrem condições adequadas ao desenvolvimento de uma população de microrganismos que promove a depuração biológica das águas residuais, seguindo-se a Decantação Secundária onde se realiza a separação de fases.

- Desinfecção

Previamente à descarga no meio receptor, a água residual tratada passa, ainda, por uma etapa de desinfecção através de radiação UV, assegurando-se deste modo a qualidade do efluente descarregado face aos usos e actividades desenvolvidas no meio receptor.

Fase Sólida

Em resultado do tratamento biológico são geradas lamas biológicas e primárias que, após extracção do sistema, são sujeitas a espessamento, digestão e desidratação, sendo depois transportadas a destino final adequado (valorização agrícola).

Acrescente-se, ainda, que no processo de digestão ocorre a geração de biogás que é armazenado num gasómetro antes da sua queima numa tocha (*flare*), prevendo-se, numa situação futura, o seu reaproveitamento.

Na Figura 2.1 apresenta-se uma fotografia aérea da ETAR de Fernão Ferro.

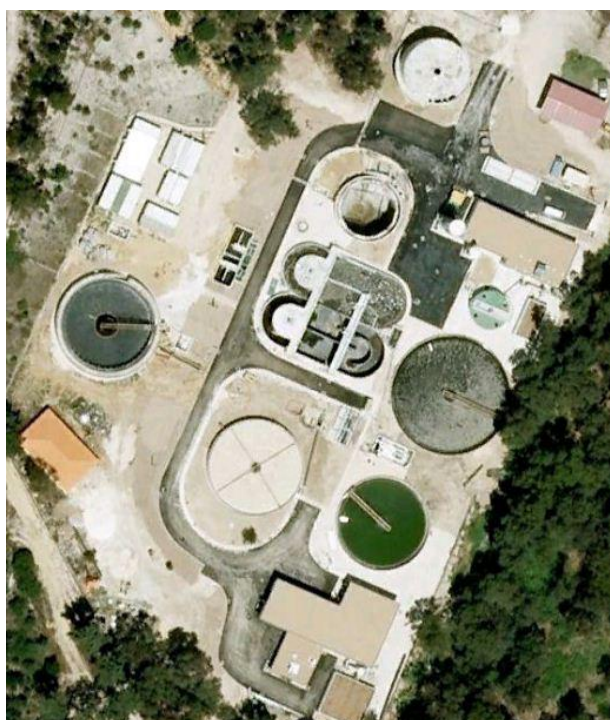


Figura 2.1. Fotografia aérea da ETAR de Fernão Ferro (Google Earth, 2011)

Na Figura 3.2 apresenta-se uma imagem do interior da ETAR onde são visíveis o decantador secundário, o tanque de digestão anaeróbia a frio, o digestor anaeróbio mesófilo e os silos de lamas estabilizadas e do reagente de estabilização de lamas.



Figura 2.2. Interior da ETAR de Fernão Ferro

2.2. Colheita de água residual

As amostras da água residual tratada, para se efectuar os ensaios de crescimento das microalgas, foram colhidas a jusante do sistema de desinfecção por ultravioletas, ou seja, após a fase terciária do tratamento. Realizaram-se duas colheitas compostas e uma colheita pontual. A colheita pontual ocorreu a 19 de Março de 2010, e as compostas foram realizadas a 7 de Abril e 18 de Maio de 2010. As amostras compostas foram obtidas através de uma colheita com duração de 24 horas, utilizando um amostrador automático da marca *ISCO* Modelo 3700 (Figura 2.3), com intervalos de 30 minutos entre a colheita de cada sub-amostra. Cada amostra tinha um volume de 190 ml, tendo sido recolhidas 48 amostras para um volume total de 9120 ml.



Figura 2.3. Amostrador automático da marca *ISCO* Modelo 3700

As amostras recolhidas foram conservadas segundo a norma internacional ISO 5567/3-1985. No local da colheita efectuaram-se medições dos parâmetros físico-químicos seguintes: pH, temperatura, condutividade, oxigénio dissolvido e potencial redox. Foram utilizados os seguintes equipamentos e metodologias apresentados na Figura 2.4.:

- a) pH – Eléctrodo de vidro com compensação de temperatura (APHA, AWWA, WPCF, 1996) da marca *HANNA Instruments*, modelo *pHScan 2*;
- b) Condutividade – Sonda de condutividade (APHA, AWWA, WPCF, 1996) da marca *Milwaukee*, modelo *CD 611*;
- c) Potencial Redox (mV) – Eléctrodo de vidro da marca *Orion*, utilizado num medidor *Orion 290A*;
- d) Oxigénio dissolvido – célula electroquímica com uma membrana permeável ao oxigénio (ISO 5814:1990) da marca *VWR*, modelo *DO 200*;
- e) Temperatura – termómetro portátil da marca *Checktemp 1*.

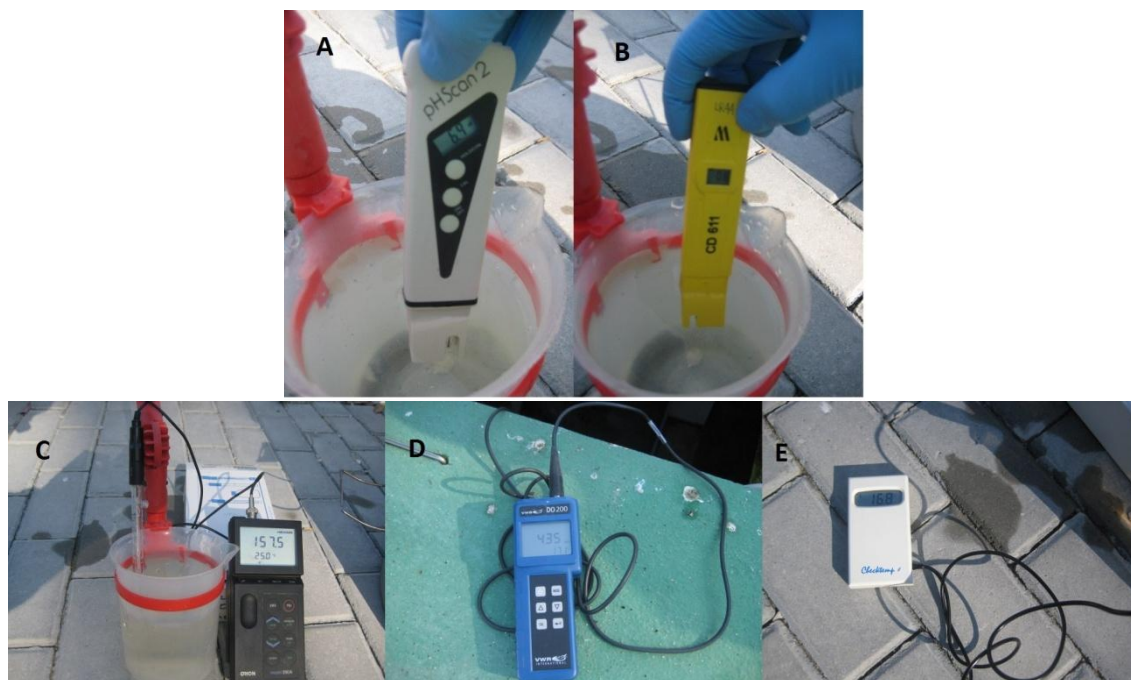


Figura 2.4. Sondas e eléctrodos utilizados nas medições in-situ. A – pH; B – Condutividade; C – Potencial redox; D – Oxigénio dissolvido; E – Temperatura;

2.3. Caracterização química da água residual

- Nitratos e Nitritos (Método espectrofotométrico)

Este método baseia-se na redução dos nitratos a nitritos com pó de zinco, sendo os nitritos posteriormente determinados pela reacção diazótica para formar um produto rosado. Os nitritos resultantes da fase de redução são determinados pela reacção do ácido sulfanílico na presença de N-(1-naftil)-etilenediamina (NED) para formar o corante azo, o qual é quantificado por espectrofotometria a um comprimento de onda de 520 nm, para os nitritos, e de 570 nm, para os nitratos. A determinação dos nitritos foi realizada directamente sobre a amostra fresca, sem a fase de redução dos nitratos.

- **Azoto Kjeldahl**

A determinação deste parâmetro iniciou-se com a mineralização, por acção do H_2SO_4 (98-99% m.v⁻¹), a quente, dos compostos orgânicos contidos na amostra. A amostra foi depois destilada por arrastamento de vapor, sendo o destilado recolhido num *erlenmeyer* contendo solução indicadora de ácido bórico. Caso as amostras contivessem azoto, a solução indicadora apresentava uma alteração de cor de roxo para verde. O azoto Kjeldahl foi depois determinado por titulação da solução indicadora de ácido bórico com H_2SO_4 (0,02 N) até a solução passar de verde a roxo.

O N-Kjeldhal foi calculado através da equação 2.1:

$$N - Kjeldahl \left(mg \, N.l^{-1} \right) = \left(\frac{D - E}{C} \right) * 280 * \left(\frac{B}{A} \right) \quad (2.1)$$

Em que,

A - Volume de amostra que foi digerida (em ml);

B - Volume do balão com o digerido (em ml);

C - Volume de digerido que foi submetido a destilação (em ml);

D - Volume de ácido sulfúrico que foi gasto na amostra (em ml);

E - Volume de ácido sulfúrico que foi gasto no branco (em ml).

- **CBO₅ (20)**

Para a medição da Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO₅) utilizou-se o método respirométrico, tendo-se recorrido a respirómetros *OXITOP* da marca *WTW*.

A diminuição do oxigénio dissolvido, devido ao consumo durante a oxidação biológica aeróbia da matéria orgânica, provoca uma diminuição da pressão dos gases no interior dos respirómetros. Esta alteração da pressão é medida por um sensor de pressão que se localiza na tampa do respirómetro, podendo ser convertida em CBO (expresso em

mg O₂.l⁻¹) através de um factor de conversão que depende do volume da amostra utilizado.

Os conteúdos dos respirómetros foram mantidos em agitação, a uma temperatura constante de 20±1°C, na ausência de luz. Em cada respirómetro adicionou-se solução tampão de fosfatos, solução de sulfato de magnésio heptahidratado, solução de cloreto de cálcio e a solução de cloreto de ferro (III) hexahidratado, numa percentagem de 0,1% (v.v⁻¹) em função do volume de amostra utilizada.

- CQO

A Carência Química de Oxigénio (CQO) é usada como uma medida do oxigénio equivalente à fracção orgânica da amostra susceptível de ser oxidada por um oxidante químico forte.

Na determinação deste parâmetro utilizou-se o método volumétrico de oxidação pelo dicromato de potássio (0,25 N), que se baseia na digestão da amostra, em refluxo aberto, na presença de sulfato de mercúrio, em meio fortemente acidificado com ácido sulfúrico (98-99%), a 160°C, durante 110 minutos. O dicromato de potássio que não foi reduzido durante a digestão foi titulado com o sulfato ferroso amoniacal (0,25 N).

O título foi calculado a partir da equação 2.2:

$$Título(t) = \frac{N \times V}{V_{tit}} \quad (2.2)$$

Em que,

N - Normalidade de dicromato de potássio (0,25N);

V – Volume de dicromato de potássio utilizado (ml);

V_{tit} – Volume da solução de sulfato ferroso amoniacal utilizado na titulação (ml).

A CQO foi calculada através da equação 2.3:

$$CQO(mgO_2.l^{-1}) = \frac{(A - B) \times t \times 8000}{C} \quad (2.3)$$

Em que,

A - Volume de titulante consumido no branco (ml);

B - Volume de titulante consumido na amostra (ml);

C - Volume da amostra (ml);

t - Título expresso em, normalidade da solução de sulfato ferroso amoniacal (0,25 N);

Factor 8000 - Massa molar de $\frac{1}{2}$ de O_2 ($mg.l^{-1}$) afectada pelo factor de correcção para se exprimir a CQO em $mg O_2.l^{-1}$.

- **Fósforo Total**

O fósforo total foi determinado através da digestão prévia das amostras com ácido sulfúrico concentrado (98-99%) e quantificação do fósforo pelo método espectrofotométrico do ácido ascórbico e molibdato de amónio.

Foi previamente construída uma recta de calibração entre a concentração de padrões de fósforo e a absorvância, medida a um comprimento de onda de 880 nm, num espectrofotómetro da marca *Cecil 9000*. As amostras digeridas foram tratadas com ácido ascórbico e molibdato de amónio (agente redutor) para darem origem à formação de um composto com coloração azul.

A quantificação do fósforo presente nas amostras foi posteriormente efectuada pela equação da recta de calibração, corrigida do volume de amostra que foi utilizado para o desenvolvimento de cor.

- **Ortofosfatos**

A quantificação dos ortofosfatos foi realizada pelo método espectrofotométrico do ácido ascórbico e molibdato de amónio.

Foi previamente construída uma recta de calibração entre a concentração de padrões de fósforo e a absorvância, medida a um comprimento de onda de 880 nm, num espectrofotómetro da marca *Cecil 9000*. As amostras foram tratadas com ácido ascórbico e molibdato de amónio (agente redutor) para darem origem à formação de um composto com coloração azul.

A quantificação dos ortofosfatos presentes nas amostras foi posteriormente efectuada pela equação da recta de calibração, corrigida do volume de amostra que foi utilizado para o desenvolvimento de cor.

- **Sólidos Suspensos Totais**

Os Sólidos Suspensos Totais (SST) foram quantificados pelo método gravimétrico, tendo-se utilizado membranas filtrantes da marca *Pall*, com uma porosidade de 0,20 µm e diâmetro de 47 mm. Este método baseia-se na filtração da amostra através da membrana filtrante, que é previamente tarada até peso constante, a 103±2°C. O resíduo que fica retido na membrana é seco, até peso constante, a 103±2°C. O aumento do peso verificado no filtro representa os sólidos suspensos totais presentes na amostra.

Os SST foram calculados através da equação 2.4:

$$SST(mg.l^{-1}) = \frac{(A - B) \times 10^6}{V_t} \quad (2.4)$$

Em que,

A – Peso da membrana filtrante após filtração e secagem (g);

B – Peso da membrana filtrante (g);

V_t – Volume total da amostra (ml).

2.4. Caracterização da microalga

A *Chlorella vulgaris* é uma microalga da divisão *Chlorophyta*, ordem *Chlorococcales*, género *Chlorella*. Tem recebido muita atenção nas áreas de nutrição, medicina e, mais recentemente, na Bioenergia. Actualmente cultivam-se cerca de 200 t.ano⁻¹ que são aplicadas no enriquecimento alimentar e suplementos nutricionais.

Esta microalga tem um elevado potencial de produção de lípidos (até 20% do peso seco), é altamente adaptável às mais variadas condições e já provou ter boa capacidade de absorção de nutrientes. É também muito utilizada na área da Ecotoxicologia, para a realização de ensaios de toxicidade.

A escolha para este ensaio deve-se ao fácil cultivo, manutenção, grande versatilidade, elevada capacidade de produção de biomassa e de absorção de nutrientes. Outro factor foi a sua disponibilidade imediata de parte do LNEG.

A microalga *Chlorella vulgaris* foi fornecida pela Unidade de Bioenergia do LNEG. Neste inóculo (cultura-mãe) a microalga da espécie *Chlorella vulgaris* era predominante, mas também foram encontradas algumas células de espécies dos géneros *Chlamydomonas* e *Scenedesmus*.

2.5. Condições de incubação e crescimento

A escolha do fotoperíodo foi baseada em valores médios anuais nacionais de insolação em 30 estações climáticas, com observações no período 1931-1960 (Grupo de Trabalho do Atlas, 1988).

Realizaram-se três ensaios de crescimento. O primeiro ensaio (ensaio A – ensaio preliminar) serviu para testar as condições gerais de funcionamento dos reactores, em especial as condições de mistura e de fornecimento de ar. No segundo e terceiro ensaios (ensaios B e C) foram simuladas diferentes condições ambientais de crescimento, tendo-se feito variar a temperatura e o fotoperíodo, segundo condições típicas de Verão e de Inverno. As condições de Verão e Inverno foram estabelecidas para a região de Lisboa, de acordo com a informação disponível no Atlas do Ambiente (Grupo de Trabalho do Atlas, 1988). As condições de crescimento ensaiadas foram as seguintes:

- Ensaios A e B – Ensaio Preliminar:
 - Temperatura – 20°C;
 - Intensidade luminosa – 3500 a 4000 lux;
 - Fotoperíodo – 12h (luz) /12h (escuro);
 - Meio de cultura – Meio mineral sintético no estado líquido (composição definida mais adiante) e água residual colhida na ETAR de Fernão Ferro (composição definida mais adiante).

- Ensaios C e D – Simulação das condições de Verão:
 - Temperatura – 20°C;
 - Intensidade luminosa – 3500 a 4000 lux;
 - Fotoperíodo – 12h (luz) /12h (escuro);
 - Meios de cultura - Meio mineral sintético no estado líquido e água residual colhida na ETAR de Fernão Ferro.

- Ensaios E e F – Simulação condições de Inverno:
 - Temperatura – 10°C;
 - Intensidade luminosa – 3500 a 4000 lux;
 - Fotoperíodo – 6h (luz) /18h (escuro);
 - Meios de cultura – Meio mineral sintético no estado líquido e água residual colhida na ETAR de Fernão Ferro.

O sistema de crescimento utilizado no Ensaio Preliminar teve as seguintes condições:

- a) Inoculou-se 400 ml da cultura-mãe em balões *erlenmeyer* de 500 ml. A agitação foi realizada numa placa de agitação orbital marca *Infors HT*, modelo *AK 82*, a 120 rpm. Os balões *erlenmeyer* foram fechados com tampas de algodão e gaze para permitir as trocas gasosas entre o meio de cultura e a atmosfera exterior.

- b) A quantidade de inóculo inicial foi calculada de forma a conseguir-se uma densidade inicial de cerca de 10 000 células/ml (DO a 670 nm = 0,015).

c) A iluminação das culturas foi realizada por 7 lâmpadas fluorescentes (*Philips daylight*), com uma potência individual de 18 W. A distribuição da intensidade luminosa na placa variava de 3500 lux na periferia até 4000 lux no centro. A intensidade luminosa foi medida com um medidor de intensidade luminosa da marca *PANTEC digital lux meter*, modelo *LM-20*.

- Acompanhou-se a evolução da Densidade óptica (670 nm) das culturas, com medições diárias num espectrofotómetro da marca *Jenway*, modelo 6300.

Os sistemas de crescimento utilizados nos Ensaios de Verão e Inverno (ensaios A, B, C, D e F) foram preparados do seguinte modo:

- a) Inoculou-se 400 ml da cultura-mãe em balões *erlenmeyer* de 500 ml. Foi introduzido um sistema de injeção de ar, de modo a simular as condições de um reactor *air-lift*, com o objectivo de se melhorar as condições de dispersão das microalgas no meio de cultura (Figura 2.5). Estes reactores foram mantidos em constante agitação (100 rpm), numa placa de agitação orbital da marca *Infors HT*, modelo *AK 82*.



Figura 2.5. Sistema de crescimento utilizado nos ensaios que simulavam as condições de Verão e Inverno

- b) O sistema de arejamento era constituído por bombas de ar comprimido, da marca *Aquapor*, modelo AC-962 (com uma potência individual de 5 W, um caudal de ar de 3,5 l/min em água a 20°C e pressão de ar superior a 0,012 Mpa).

Estas bombas de ar comprimido foram ligadas, por tubos de silicone, a pipetas de 1 ml. Cada bomba efectuava o arejamento de quatro reactores. Estas pipetas eram mantidas na posição vertical através da pressão exercida pelas rolhas de algodão e gaze (Figura 2.6).

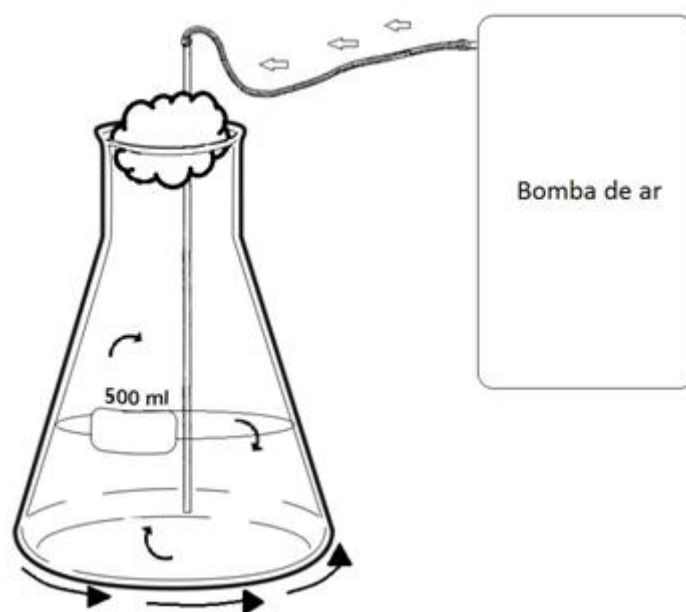


Figura 2.6. Esquema representativo do sistema de crescimento

- c) A quantidade de inóculo inicial foi calculada de forma a conseguir-se uma população inicial de cerca de 10 000 células/ml (DO a 670 nm = 0,015).
- d) A iluminação das culturas foi realizada por 7 lâmpadas fluorescentes (*Philips daylight*), com uma potência individual de 18 W. A distribuição da intensidade luminosa na placa variava de 3500 lux na periferia até 4000 lux no centro. A

intensidade luminosa foi medida com um medidor de intensidade luminosa da marca *PANTEC digital lux meter*, modelo LM-20.

e) Acompanhou-se a evolução dos seguintes parâmetros da cultura no decorrer dos ensaios:

- Densidade óptica (670 nm) – medições diárias num espectrofotómetro da marca *Jenway*, modelo 6300;
- Sólidos Suspensos Totais – medições diárias, de acordo com a metodologia definida anteriormente;
- Nitratos – medições efectuadas com uma periodicidade de 3 vezes por semana, de acordo com a metodologia definida anteriormente;
- Nitritos – medições efectuadas com uma periodicidade de 3 vezes por semana, de acordo com a metodologia definida anteriormente;
- Ortofosfatos – medições efectuadas com uma periodicidade de 3 vezes por semana, de acordo com a metodologia definida anteriormente.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

2.5.1. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios de crescimento das microalgas foram os seguintes:

- a) Água residual tratada colhida na ETAR de Fernão Ferro;
- b) Meio de cultura mineral, no estado líquido, modificado da norma ISO 8692.

A modificação do meio de cultura mineral, definido na norma ISO 8692, foi efectuada ao nível da fonte de azoto. Na norma ISO 8692 encontra-se definido o azoto amoniacal (NH_4Cl) como fonte de azoto. Considerando que a água residual tratada, que foi colhida na ETAR de Fernão Ferro, seria constituída por nitratos, optou-se por se utilizar o nitrato de sódio como fonte de azoto no meio de cultura mineral para simular o mesmo tipo de fonte de azoto existente na água residual tratada.

A composição das soluções-mãe do meio de cultura mineral que foi utilizado no presente trabalho encontra-se descrita no Quadro 2.1.

Quadro 2.1. Composição das soluções-mãe utilizadas na preparação do meio de cultura mineral

Substância Nutritiva	Concentração	Unidade
Sol. 1		
NaNO ₃	2,386	g.l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,16	g.l ⁻¹
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,2	g.l ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,8	g.l ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5	g.l ⁻¹
Sol. 2		
FeCl ₃ .6H ₂ O	80	mg.l ⁻¹
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	100	mg.l ⁻¹
Sol. 3		
H ₃ BO ₃	185	mg.l ⁻¹
MnCl ₂ .4H ₂ O	415	mg.l ⁻¹
ZnCl ₂	3	mg.l ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	1,5	mg.l ⁻¹
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,01	mg.l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	7	mg.l ⁻¹
Sol. 4		
NaHCO ₃	50	g.l ⁻¹

Nota: Todas as concentrações se encontram expressas nas fórmulas químicas indicadas no quadro

Para se preparar 1 litro de meio juntou-se 100 ml da solução 1 e 10 ml das soluções 2, 3 e 4.

No Quadro 2.2 apresentam-se as marcas e os graus de pureza dos compostos químicos utilizados na preparação das soluções-mãe do meio nutritivo mineral.

Quadro 2.2. Marcas e os graus de pureza dos compostos químicos utilizados na preparação das soluções-mãe do meio nutritivo mineral

Composto	Marca	Grau de pureza (%)
NaNO ₃	Riedel-de Haën	99,5
KH ₂ PO ₄	Riedel-de Haën	99,5
MgCl ₂ .6H ₂ O	Riedel-de Haën	99,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	Acros	95,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	Panreac	98,0
FeCl ₃ .6H ₂ O	Merck	99,0
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	Panreac	99,0
H ₃ BO ₃	Riedel-de Haën	99,8
MnCl ₂ .4H ₂ O	Merck	99,0
ZnCl ₂	Riedel-de Haën	98,0
CoCl ₂ .6H ₂ O	Merck	99,0
CuCl ₂ .2H ₂ O	Riedel-de Haën	99,0
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Riedel-de Haën	99,5
NaHCO ₃	Panreac	99,7

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização química da água residual

Os valores apresentados no Quadro 3.1 correspondem aos parâmetros analisados na água residual tratada da ETAR de Fernão Ferro, relativamente aos parâmetros que foram determinados no momento da colheita e aos que foram determinados no laboratório.

Quadro 3.1. – Caracterização físico-química do efluente tratado da ETAR de Fernão Ferro

Parâmetro	Unidades	Data de colheita			Média	D. p.
		19-03-10	07-04-10	18-05-10		
Temperatura	°C	16,9	16,9	20,3	18,03	1,96
pH	Sorensen	7,10	6,90	6,80	6,93	0,15
Oxigénio dissolv.	mg O ₂ .l ⁻¹	4,55	4,35	3,73	4,21	0,43
Potencial redox	mV	177	144	137	153	21
Condutividade	μS.cm ⁻¹	700	800	700	733	58
CQO	mg O ₂ .l ⁻¹	29,7	29,4	39,7	32,9	5,9
CBO ₅ (20)	mg O ₂ .l ⁻¹	4	4	4	4	0
SST	mg.l ⁻¹	20	30	20	23	6
N-Kjeldahl	mg N.l ⁻¹	<1,12	<1,12	<1,12	s.s.	s.s.
NO ₃ ⁻	mg NO ₃ .l ⁻¹	42	42	57	47	9
NO ₂ ⁻	mg NO ₂ .l ⁻¹	7,9	7,2	12,5	9,2	2,9
Ortofosfatos	mg P.l ⁻¹	14,8	13,5	6,3	11,5	4,6
P-total	mg P.l ⁻¹	16,2	16,2	6,9	13,1	5,4

D.p.: Desvio padrão; s.s.: Sem significado

No Quadro 3.2. apresenta-se a caracterização físico-química do meio sintético ISO 8692.

Quadro 3.2. – Caracterização química do meio ISO 8692

Parâmetro	Unidades	Resultado Analítico
pH	Sorensen	7,5
Oxigénio dissolv.	mg O ₂ .l ⁻¹	n.d.
Potencial redox	mV	n.d.
Condutividade	μS.cm ⁻¹	n.d.
CQO	mg O ₂ .l ⁻¹	<10
CBO ₅ (20)	mg O ₂ .l ⁻¹	<1

n.d.: não determinado

Quadro 3.2. – (cont.)

Parâmetro	Unidades	Resultado Analítico
SST	mg.l ⁻¹	0,6
N-Kjeldahl	mg N.l ⁻¹	<1,12
NO ₃ ⁻	mg NO ₃ .l ⁻¹	218
NO ₂ ⁻	mg NO ₂ .l ⁻¹	1,2
Ortofosfatos	mg P.l ⁻¹	23

As caracterizações químicas efectuadas antes do início dos ensaios permitiram determinar as razões azoto/fósforo dos meios de cultura, através da divisão da soma das concentrações de nitratos e nitritos pela concentração de fósforo total para a água residual e da soma das concentrações de nitratos e nitritos pela concentração de ortofosfatos para o meio mineral (Quadro 3.3).

Quadro 3.3. – Razões N:P para os diversos ensaios

Ensaio	Razão N:P
Ensaio Preliminar no Meio ISO 8692	10:1
Ensaio Preliminar na Água Residual Tratada	3:1
Ensaio em condições de Verão no Meio ISO 8692	8:1
Ensaio em condições de Verão na Água Residual Tratada	2:1
Ensaio em condições de Inverno no Meio ISO 8692	20:1
Ensaio em condições de Inverno na Água Residual Tratada	4:1

3.2. Ensaios de crescimento microalgal

O registo diário da densidade óptica (DO), a 670 nm, no meio ISO 8692 e na água residual tratada permitiu elaborar as curvas de crescimento da cultura de microalgas, relativamente aos ensaios preliminares e ensaios nas condições de Verão e Inverno, baseada na variação da densidade óptica, (expressa através do quociente DO medida/DO inicial da cultura (DO₀)), em função do tempo de ensaio (Figuras 3.1 e 3.2.).

O cálculo dos logaritmos neperianos dos valores de DO/DO₀ permitiu estabelecer o período de duração das fases de crescimento exponencial em cada um dos meios de cultura: a) Ensaio preliminar no meio ISO 8692 (Fig. 3.3A) - t = [2;10] dias; b) Ensaio preliminar na água residual tratada (Fig. 3.3B) - t = [0;7] dias; c) Ensaio nas condições de Verão no meio ISO 8692 (Fig. 3.3C) – t = [0;6] dias; d) Ensaio nas condições de Verão

na água residual tratada (Fig. 3.3D) - $t = [0;7]$ dias; e) Ensaio nas condições de Inverno no meio ISO 8692 (Fig. 3.3E) - $t = [0;15]$ dias; f) Ensaio nas condições de Inverno na água residual tratada (Fig. 3.3F) - $t = [0;15]$ dias. Através do ajustamento de uma regressão linear aos valores compreendidos na fase de crescimento exponencial foi possível determinar os valores das taxas específicas de crescimento baseada na DO, μ , para cada meio de cultura e para cada condição de incubação (Figura 3.3).

O registo diário da concentração de sólidos suspensos totais (SST) no meio ISO 8692 e na água residual tratada permitiu elaborar as curvas de crescimento da cultura de microalgas, relativamente aos ensaios nas condições de Verão e Inverno, expressos pelo quociente SST medido/SST inicial da cultura (SST_0), em função do tempo de ensaio (Figura 3.4 e 3.5).

O cálculo dos logaritmos neperianos dos valores de SST/SST_0 permitiu estabelecer o período de duração das fases de crescimento exponencial em cada um dos meios de cultura: a) Ensaio nas condições de Verão no meio ISO 8692 (Fig. 3.6C) - $t = [0;6]$ dias; b) Ensaio nas condições de Verão na água residual tratada (Fig. 3.6D) - $t = [0;7]$ dias; c) Ensaio nas condições de Inverno no meio ISO 8692 (Fig. 3.6E) - $t = [0;15]$ dias; d) Ensaio nas condições de Inverno na água residual tratada (Fig. 3.6F) - $t = [0;15]$ dias. Através do ajustamento de uma regressão linear aos valores compreendidos na fase de crescimento exponencial foi possível determinar os valores das taxas específicas de crescimento, baseada nos SST, μ_b , para cada meio de cultura e para cada condição de incubação (Figura 3.6).

A determinação das concentrações de nitratos, nitritos e fosfatos, com uma frequência de três vezes por semana, nos ensaios em condições de Verão e Inverno, permitiu a elaboração das curvas de consumo de nutrientes: N (soma das concentrações de nitratos e nitritos) vs tempo de ensaio (Figura 3.7 e 3.8) e P (sob a forma de PO_4^{3-}) vs tempo de ensaio (Figura 3.9 e 3.10)

Através da equação 1.4 foi possível determinar as proporções de remoção de N e P, expressas por $(1 - N/N_0)$ e $(1 - P/P_0)$, as quais são apresentadas nas Figuras 3.11 e 3.12.

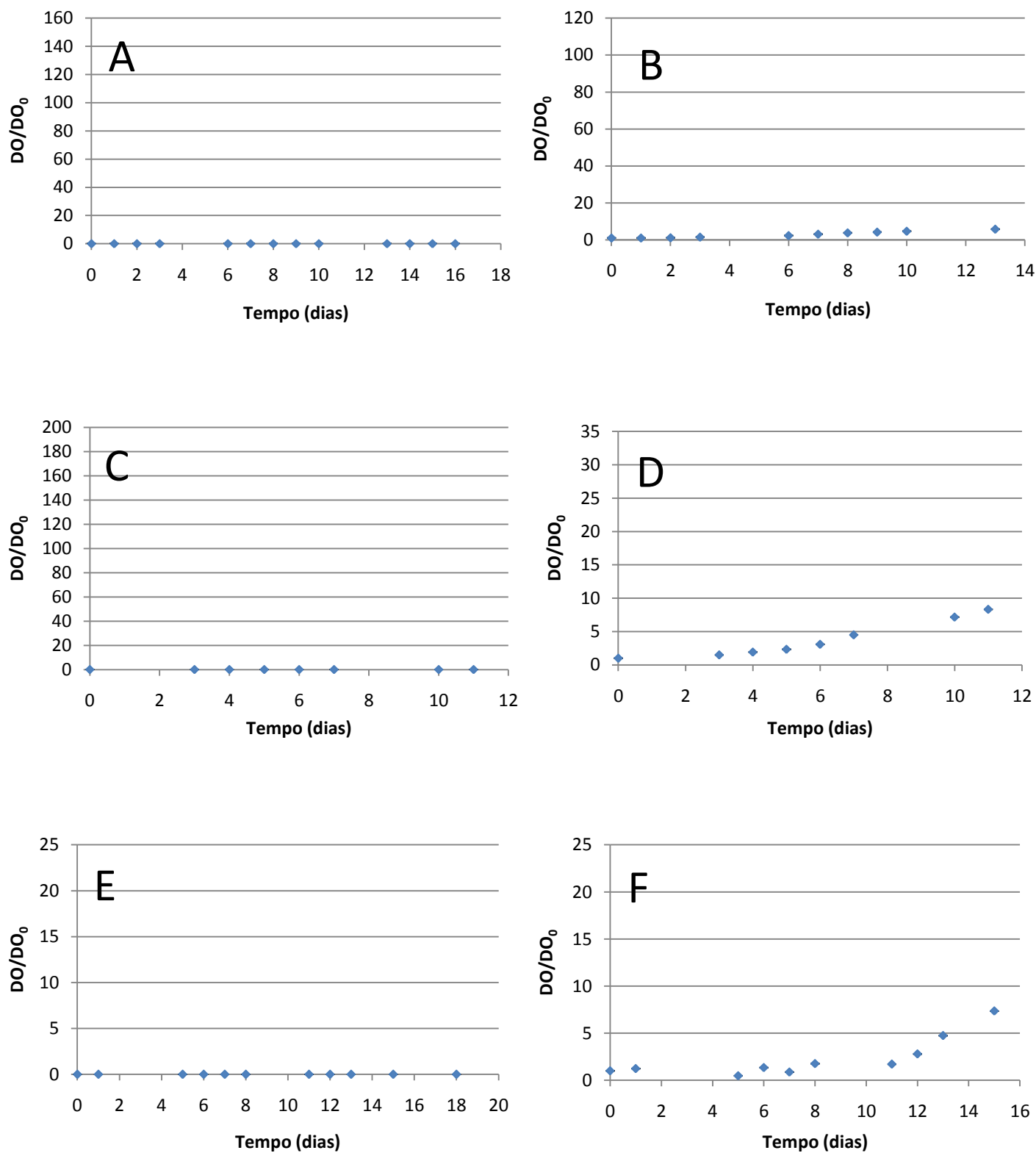


Figura 3.1. - Variação da DO/DO₀ vs tempo nos ensaios brancos nas seguinte condições: A – Ensaio preliminar no meio ISO 8692; B – Ensaio preliminar na água residual tratada; C - Ensaio nas condições de Verão no meio ISO 8692; D - Ensaio nas condições de Verão na água residual tratada; E - Ensaio nas condições de Inverno no meio ISO 8692; F - Ensaio nas condições de Inverno na água residual tratada

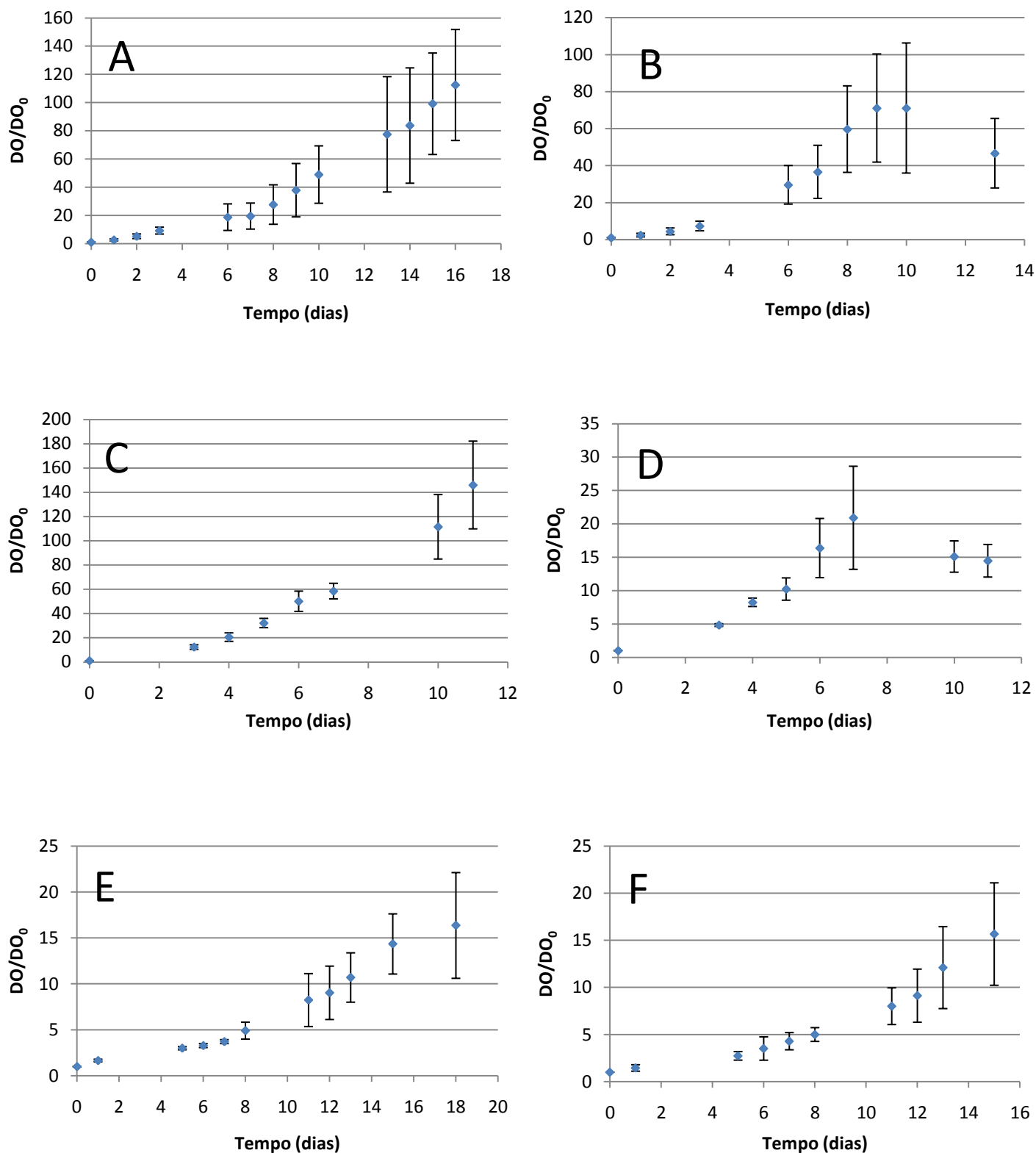


Figura 3.2. - Variação da DO/DO_0 vs tempo nas seguinte condições: A – Ensaio preliminar no meio ISO 8692; B – Ensaio preliminar na água residual tratada; C - Ensaio nas condições de Verão no meio ISO 8692; D - Ensaio nas condições de Verão na água residual tratada; E - Ensaio nas condições de Inverno no meio ISO 8692; F - Ensaio nas condições de Inverno na água residual tratada

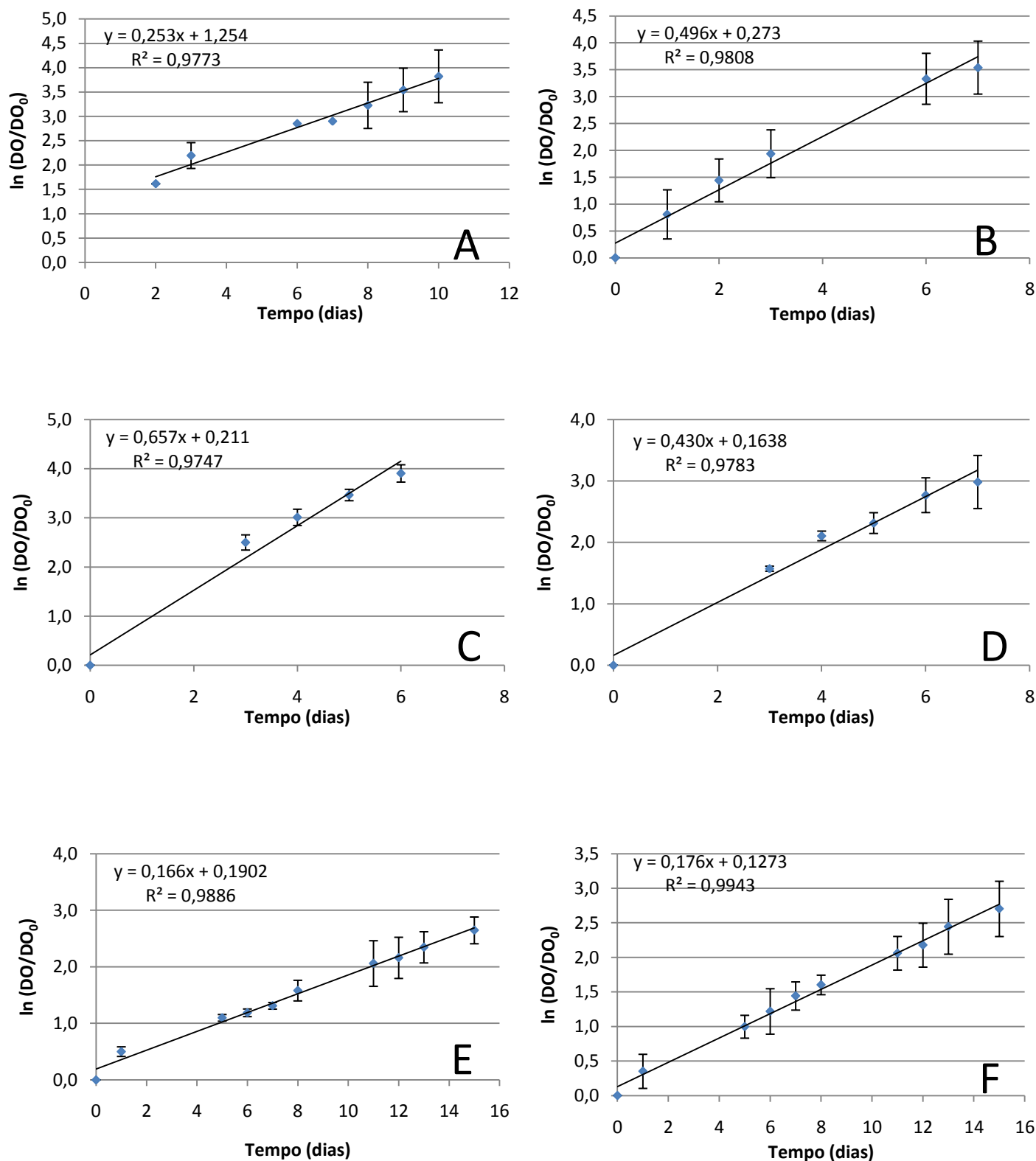


Figura 3.3. - Variação do logaritmo de DO/DO₀ vs tempo nas seguinte condições: A – Ensaio preliminar no meio ISO 8692; B – Ensaio preliminar na água residual tratada; C - Ensaio nas condições de Verão no meio ISO 8692; D - Ensaio nas condições de Verão na água residual tratada; E - Ensaio nas condições de Inverno no meio ISO 8692; F - Ensaio nas condições de Inverno na água residual tratada

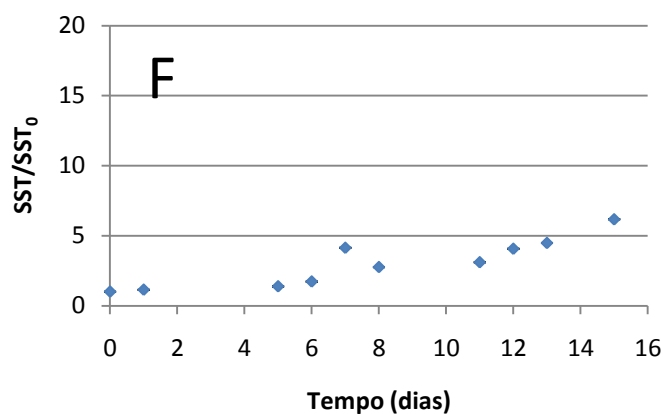
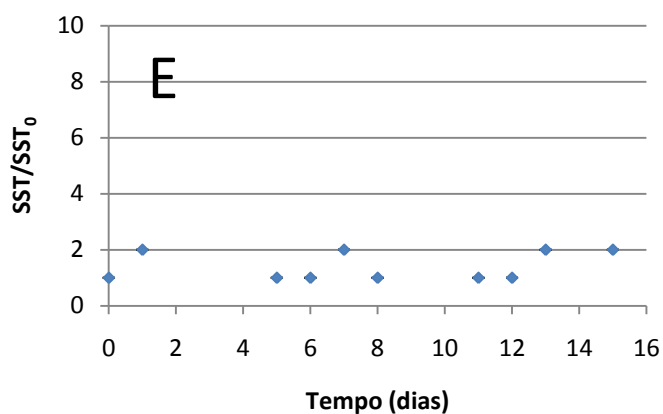
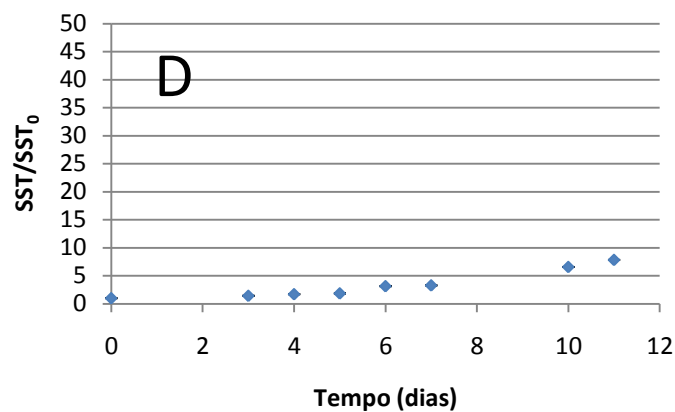
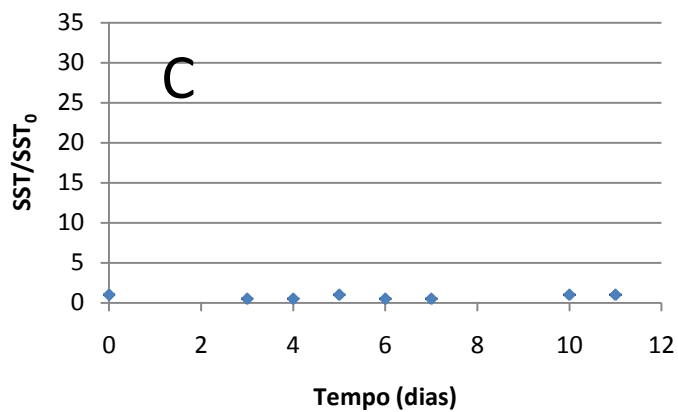


Figura 3.4. - Variação dos SST/SST₀ vs tempo nos ensaios brancos nas seguinte condições: C - Ensaio nas condições de Verão no meio ISO 8692; D - Ensaio nas condições de Verão na água residual tratada; E - Ensaio nas condições de Inverno no meio ISO 8692; F - Ensaio nas condições de Inverno na água residual tratada

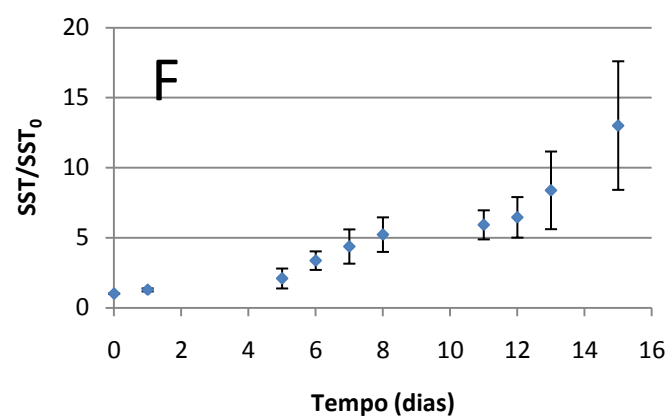
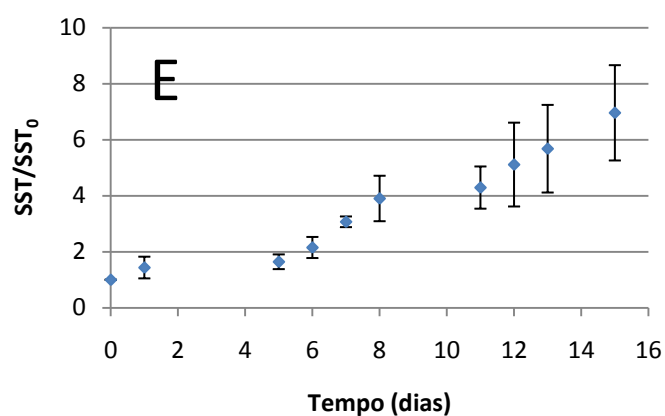
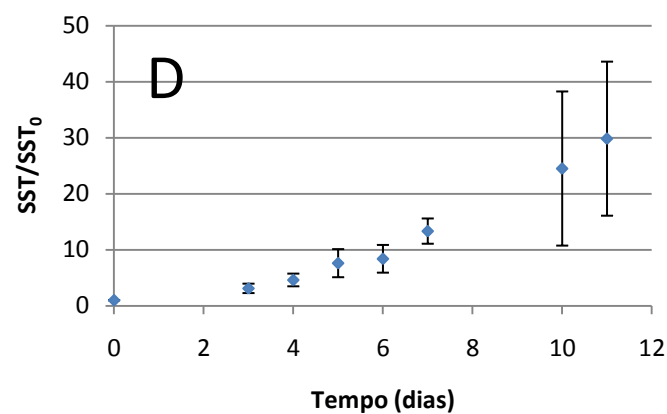
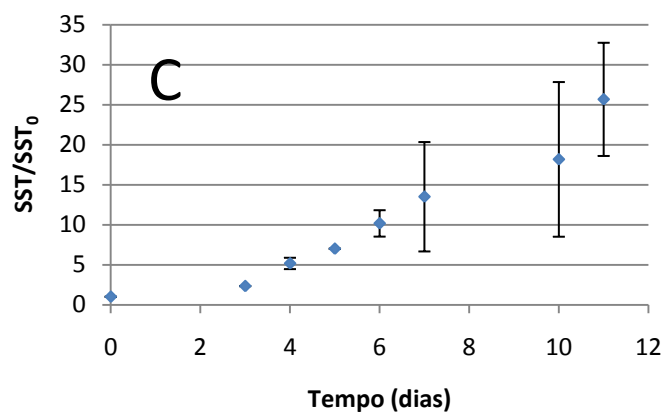


Figura 3.5. - Variação dos SST/SST₀ vs tempo nas seguintes condições: C - Ensaio nas condições de Verão no meio ISO 8692; D - Ensaio nas condições de Verão na água residual tratada; E - Ensaio nas condições de Inverno no meio ISO 8692; F - Ensaio nas condições de Inverno na água residual tratada

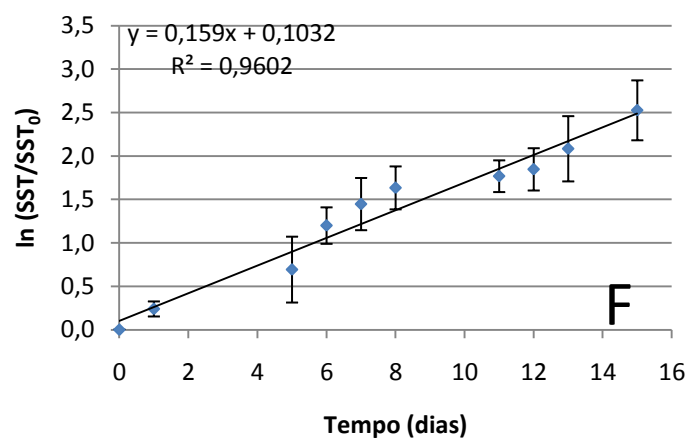
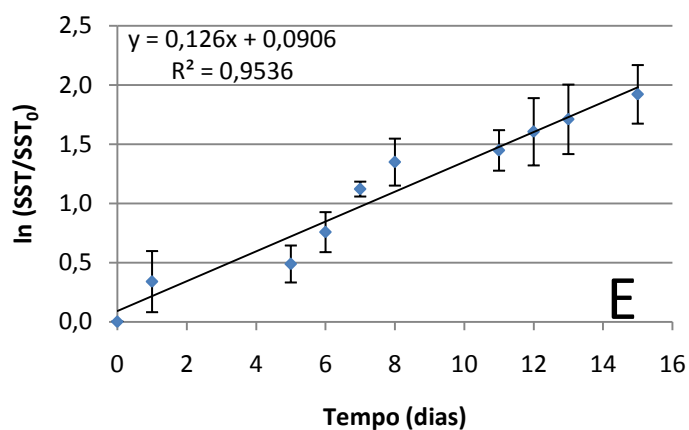
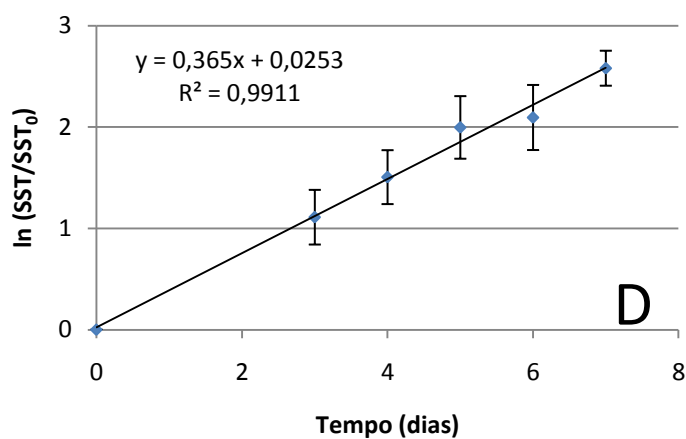
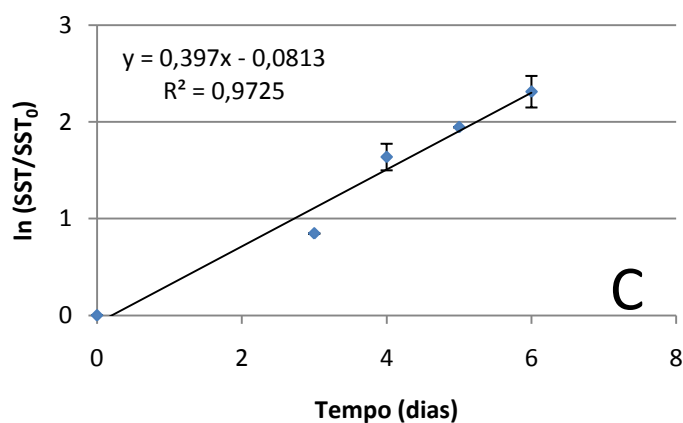


Figura 3.6. - Variação do logaritmo de SST/SST_0 vs tempo nas seguinte condições: C - Ensaio nas condições de Verão no meio ISO 8692; D - Ensaio nas condições de Verão na água residual tratada; E - Ensaio nas condições de Inverno no meio ISO 8692; F - Ensaio nas condições de Inverno na água residual tratada

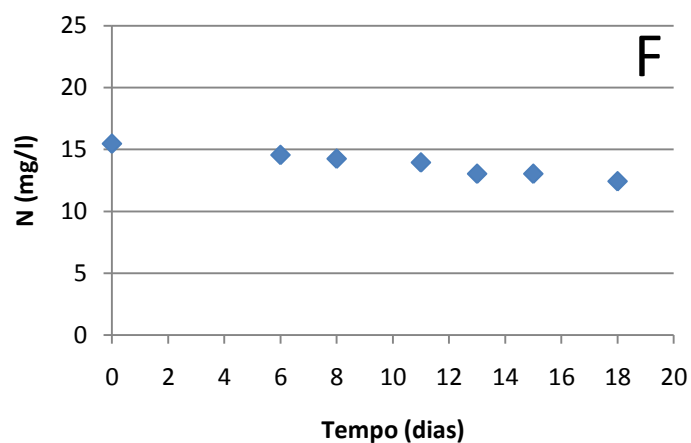
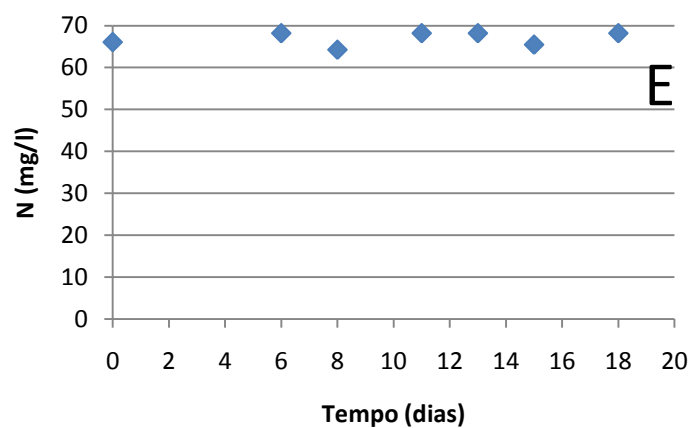
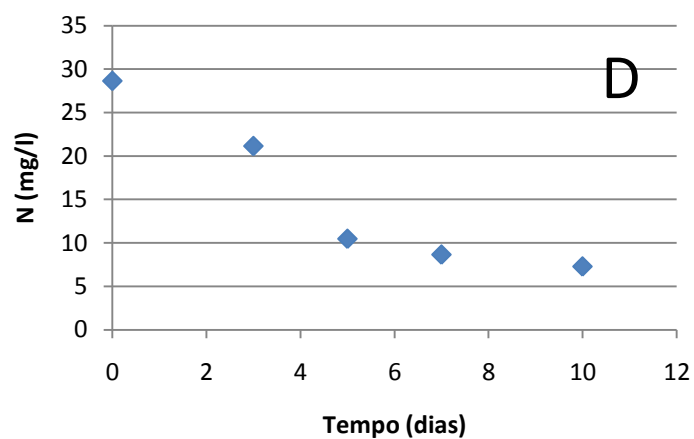
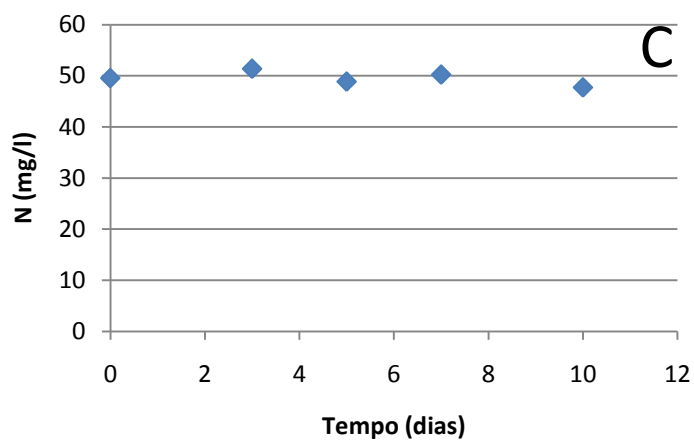


Figura 3.7. - Variação de N vs tempo nos ensaios brancos nas seguintes condições: C - Ensaio nas condições de Verão no meio ISO 8692; D - Ensaio nas condições de Verão na água residual tratada; E - Ensaio nas condições de Inverno no meio ISO 8692; F - Ensaio nas condições de Inverno na água residual tratada

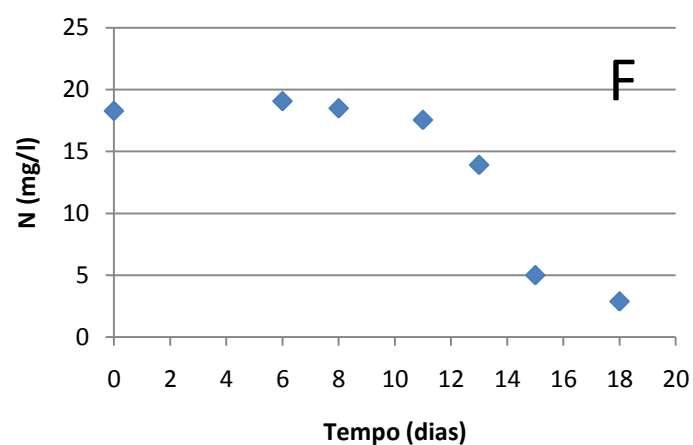
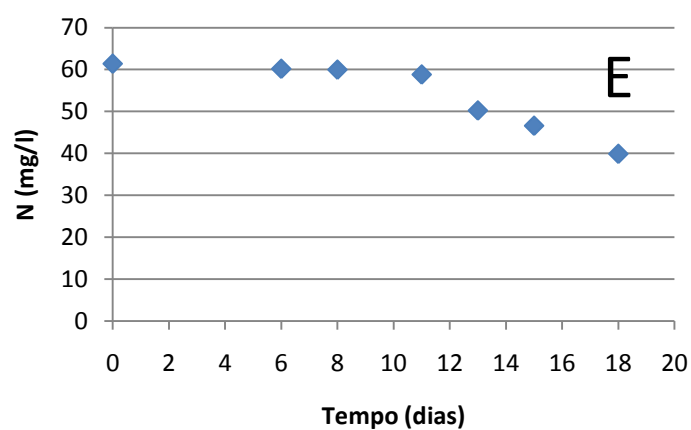
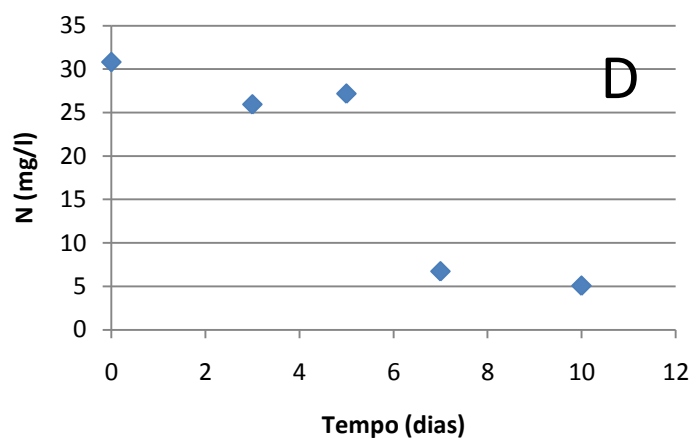
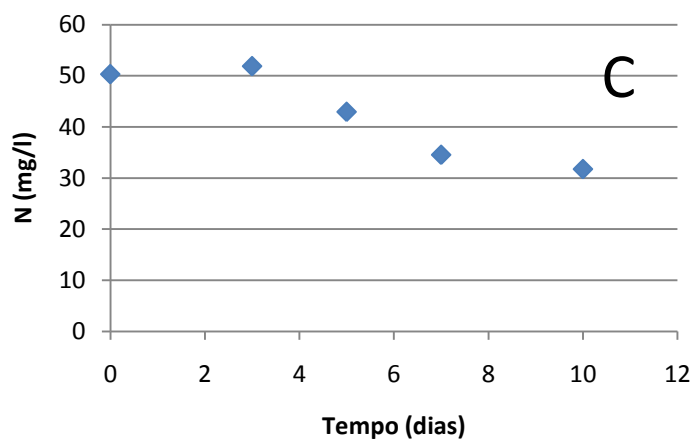


Figura 3.8. - Variação de N vs tempo nas seguintes condições: C - Ensaio nas condições de Verão no meio ISO 8692; D - Ensaio nas condições de Verão na água residual tratada; E - Ensaio nas condições de Inverno no meio ISO 8692; F - Ensaio nas condições de Inverno na água residual tratada

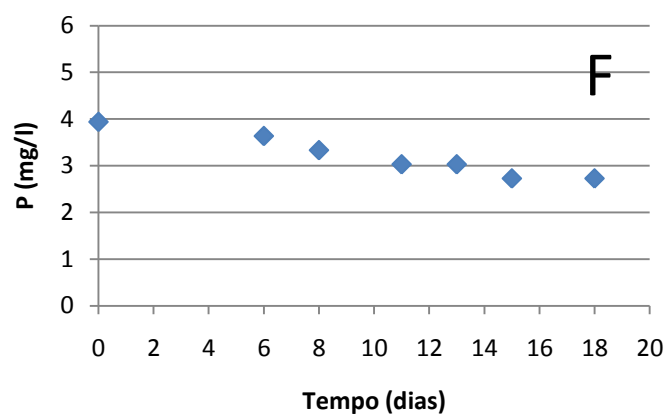
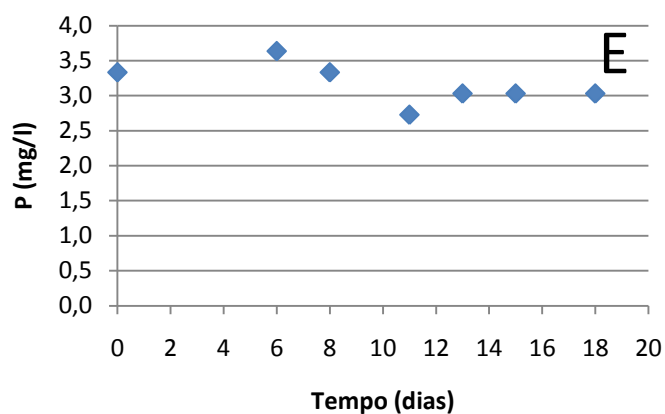
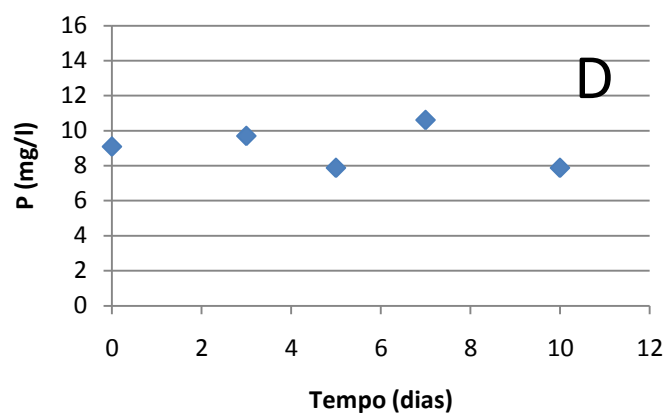
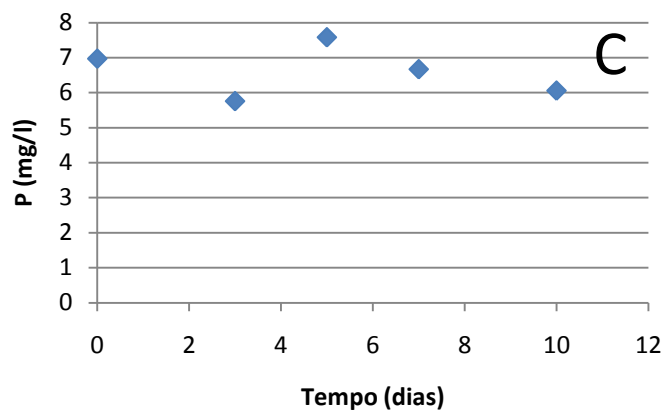


Figura 3.9. - Variação de P vs tempo nos ensaios brancos nas seguintes condições: C - Ensaio nas condições de Verão no meio ISO 8692; D - Ensaio nas condições de Verão na água residual tratada; E - Ensaio nas condições de Inverno no meio ISO 8692; F - Ensaio nas condições de Inverno na água residual tratada

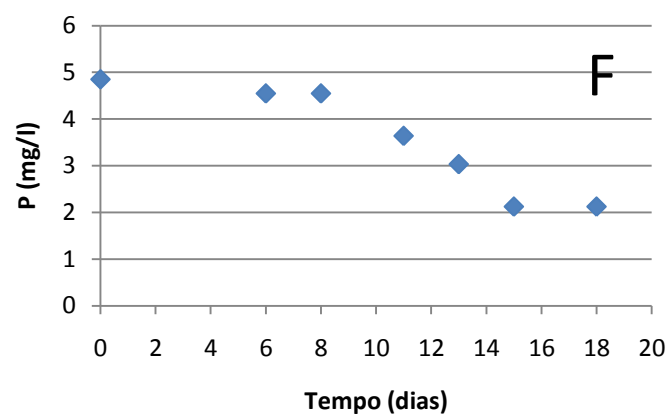
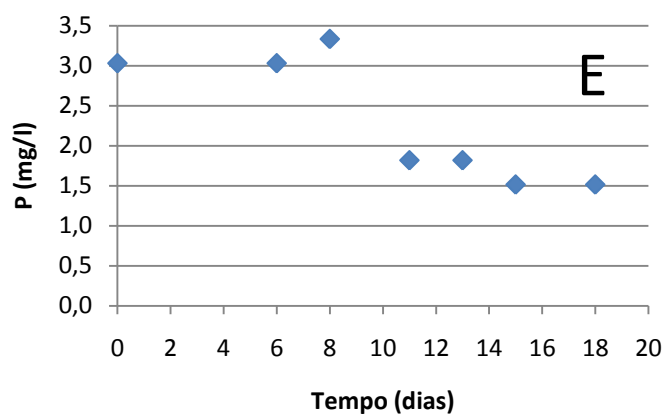
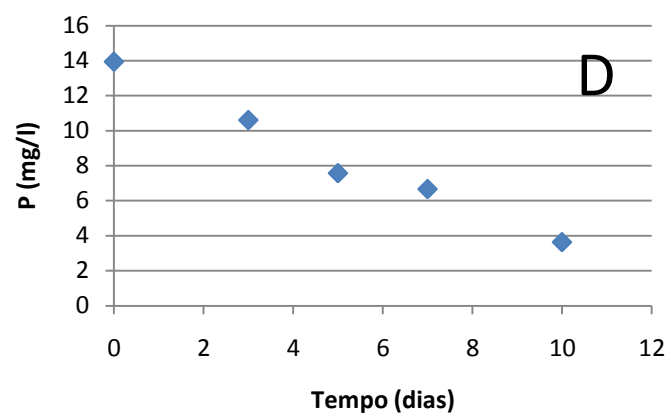
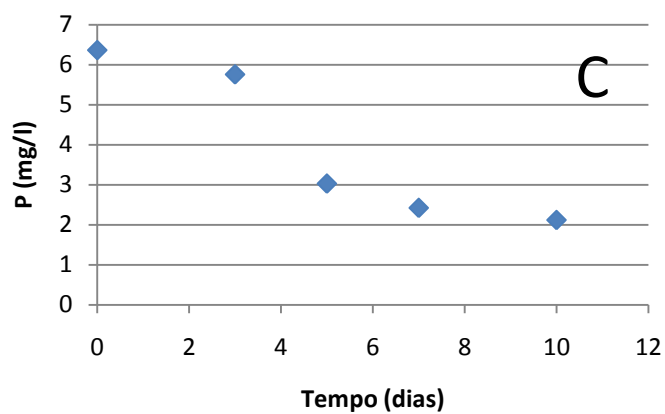


Figura 3.10. - Variação de P vs tempo nas seguintes condições: C - Ensaio nas condições de Verão no meio ISO 8692; D - Ensaio nas condições de Verão na água residual tratada; E - Ensaio nas condições de Inverno no meio ISO 8692; F - Ensaio nas condições de Inverno na água residual tratada

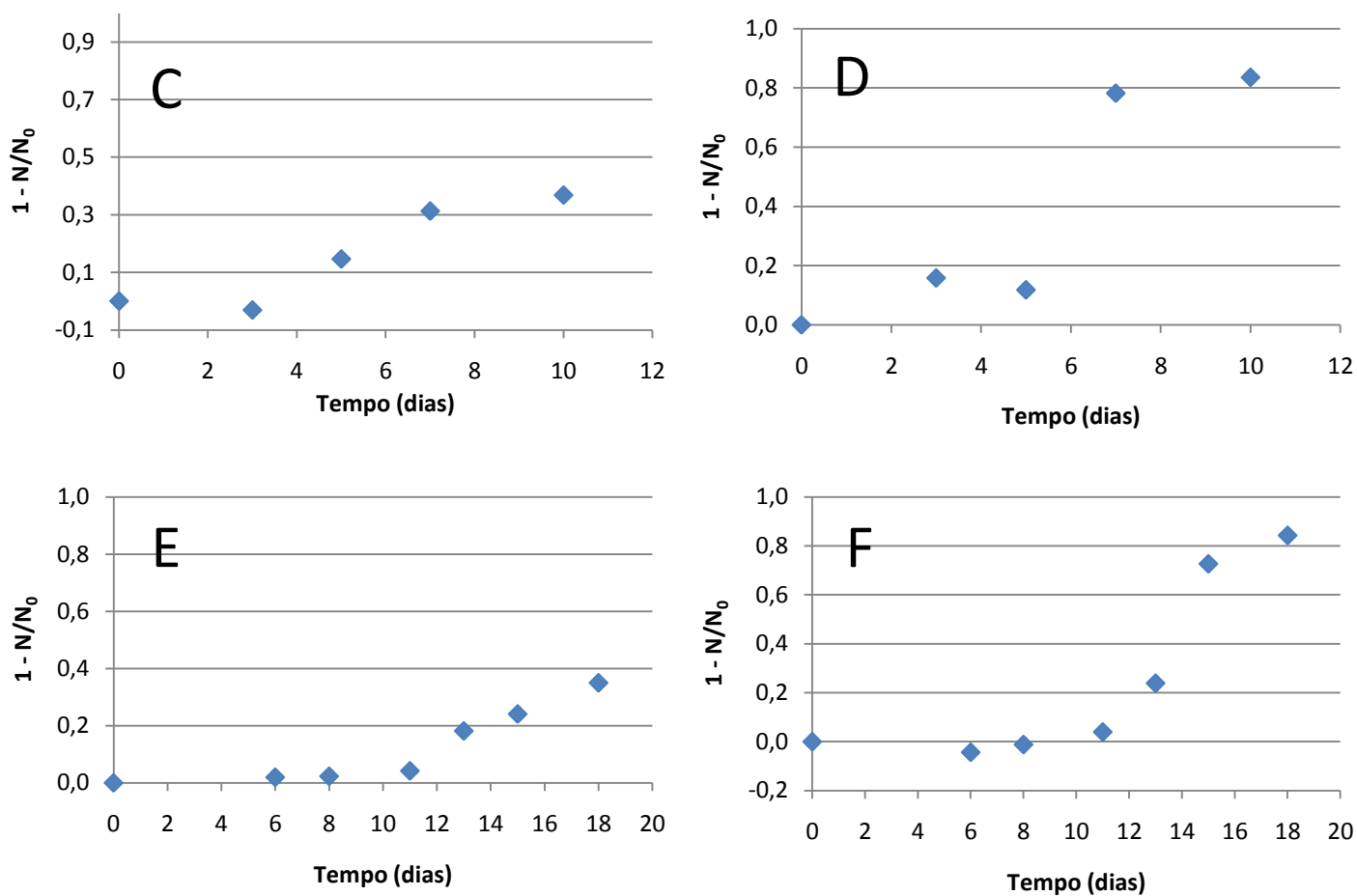


Figura 3.11. - Variação de $(1 - N/N_0)$ vs tempo nas seguintes condições: C - Ensaio nas condições de Verão no meio ISO 8692; D - Ensaio nas condições de Verão na água residual tratada; E - Ensaio nas condições de Inverno no meio ISO 8692; F - Ensaio nas condições de Inverno na água residual tratada

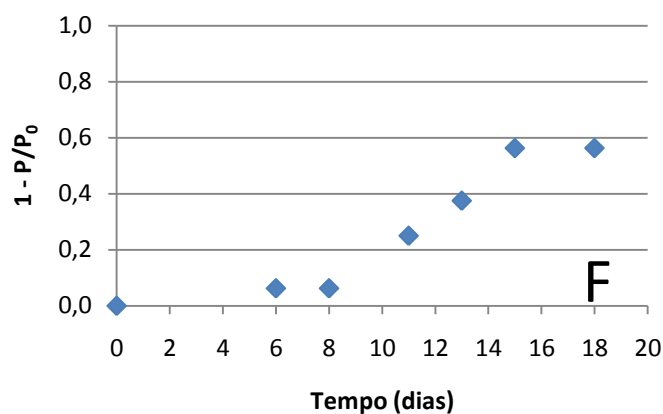
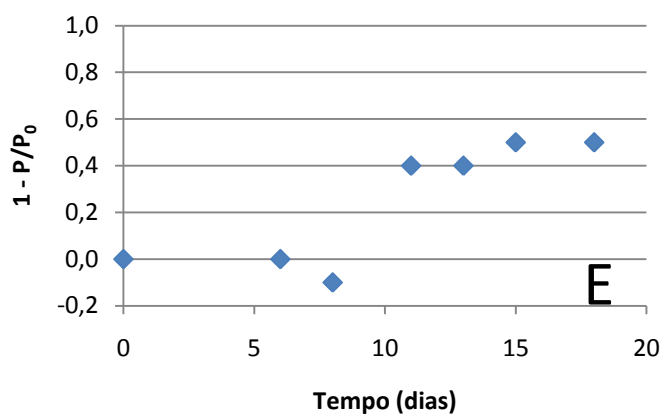
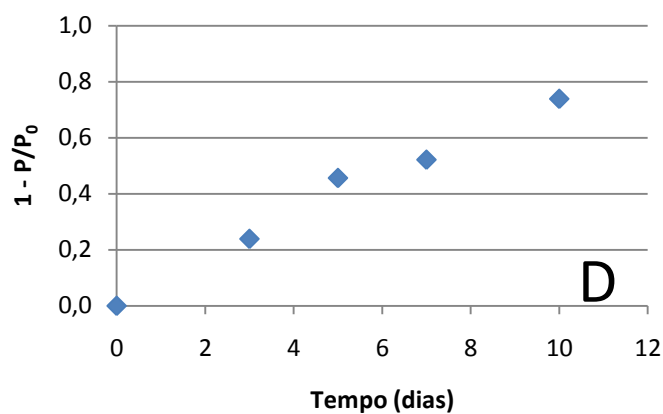
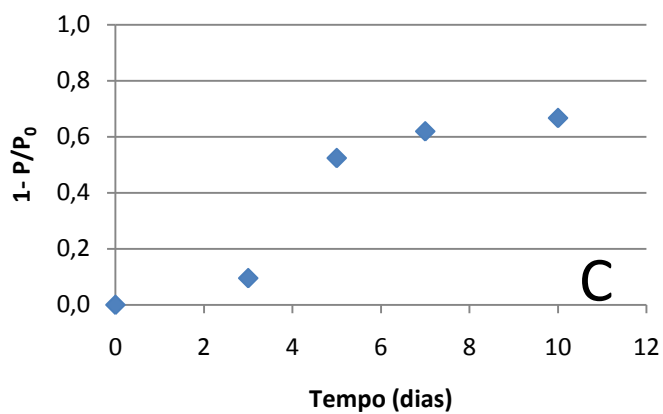


Figura 3.12. - Variação de $(1 - P/P_0)$ vs tempo nas seguinte condições: C - Ensaio nas condições de Verão no meio ISO 8692; D - Ensaio nas condições de Verão na água residual tratada; E - Ensaio nas condições de Inverno no meio ISO 8692; F - Ensaio nas condições de Inverno na água residual tratada

3.3. Taxas específicas de crescimento

A linearização das fases exponenciais das curvas de crescimento, relativamente a DO/DO_0 (μ (d^{-1})) e a SST/SST_0 , permitiu determinar, através do declive das regressões lineares ajustadas, as taxas específicas de crescimento que se encontram apresentadas no Quadro 3.4.

Quadro 3.4. Taxas específicas de crescimento determinadas para cada meio de cultura e para cada condição de incubação

Ensaio	μ (d^{-1})	μ_b (d^{-1})
Ensaio Preliminar no Meio ISO 8692	0,253	n.d.
Ensaio Preliminar na Água Residual Tratada	0,496	n.d.
Ensaio em condições de Verão no Meio ISO 8692	0,657	0,397
Ensaio em condições de Verão na Água Residual Tratada	0,430	0,365
Ensaio em condições de Inverno no Meio ISO 8692	0,166	0,126
Ensaio em condições de Inverno na Água Residual Tratada	0,176	0,159

μ : taxa específica de crescimento determinada com base nos dados de DO; μ_b : taxa específica de crescimento determinada com base nos dados de SST; n.d.: não determinado

3.4. Taxas de remoção de azoto e fósforo

A determinação das concentrações de nitratos, nitritos e fosfatos no meio ISO 8692 e na água residual tratada ao longo de todo o tempo dos ensaios, em condições de incubação de Verão e Inverno, permitiu determinar, através da equação (1.5), as taxas de remoção de N e P para a totalidade da duração dos ensaios de crescimento (Quadro 3.5).

Quadro 3.5. Taxas de remoção de azoto e fósforo para a totalidade da duração dos ensaios de crescimento

Ensaio	% remoção N	% remoção P
Ensaio Preliminar no Meio ISO 8692	n.d.	n.d.
Ensaio Preliminar na Água Residual Tratada	n.d.	n.d.
Ensaio em condições de Verão no Meio ISO 8692	37	67
Ensaio em condições de Verão na Água Residual Tratada	84	74
Ensaio em condições de Inverno no Meio ISO 8692	35	50
Ensaio em condições de Inverno na Água Residual Tratada	84	56

n.d.: não determinado

Com base na determinação das concentrações de nitratos, nitritos e fosfatos no meio ISO 8692 e na água residual tratada, durante as fases de crescimento exponencial dos ensaios em condições de Verão e Inverno, permitiu determinar, através da equação (1.5), os valores apresentados no Quadro 3.6.

Quadro 3.6. - Taxas de remoção de azoto e fósforo nas fases de crescimento exponencial

Ensaio	% remoção N	% remoção P
Ensaio Preliminar no Meio ISO 8692	n.d.	n.d.
Ensaio Preliminar na Água Residual Tratada	n.d.	n.d.
Ensaio em condições de Verão no Meio ISO 8692	31	62
Ensaio em condições de Verão na Água Residual Tratada	78	52
Ensaio em condições de Inverno no Meio ISO 8692	24	50
Ensaio em condições de Inverno na Água Residual Tratada	73	56

n.d.: não determinado

3.5. Taxas volumétricas de formação de biomassa e consumo de nutrientes

O registo dos valores de SST, N (soma das concentrações de nitratos e nitritos) e P (na forma de PO_4^{3-}) ao longo de todo o tempo dos ensaios, em condições de Verão e Inverno, permitiu determinar, através da equação 1.1, as taxas volumétricas de consumo de azoto e fósforo e de formação de biomassa (Quadro 3.7).

Quadro 3.7. - Taxas volumétricas de formação de biomassa (TVSST) e de consumo de nutrientes (TVN e TVP)

Ensaio	TVSST (mg SST.l ⁻¹ .d ⁻¹)	TVN (mg N.l ⁻¹ .d ⁻¹)	TVP (mg P.l ⁻¹ .d ⁻¹)
Ensaio Preliminar no Meio ISO 8692	n.d.	n.d.	n.d.
Ensaio Preliminar na Água Residual Tratada	n.d.	n.d.	n.d.
Ensaio em condições de Verão no Meio ISO 8692	67,27	1,85	0,42

nd: não determinado

Quadro 3.7. (cont.)

Ensaio	TVSST (mg SST.l⁻¹.d⁻¹)	TVN (mg N.l⁻¹.d⁻¹)	TVP (mg P.l⁻¹.d⁻¹)
Ensaio em condições de Verão na Água Residual Tratada	56,97	2,58	1,03
Ensaio em condições de Inverno no Meio ISO 8692	12,93	1,19	0,08
Ensaio em condições de Inverno na Água Residual Tratada	19,31	0,86	0,15

3.6. Quocientes metabólicos de consumo de azoto e fósforo por unidade de biomassa formada

A divisão da TVN e TVP pela TVSST permitiu calcular o quociente metabólico de consumo de nutrientes por unidade de biomassa formada (Quadro 3.8).

Quadro 3.8. – Quocientes metabólico de consumo de azoto e fósforo por unidade de biomassa formada

Ensaio	TV N/TV SST	TV P/ TV SST
Ensaio Preliminar no Meio ISO 8692	n.d.	n.d.
Ensaio Preliminar na Água Residual Tratada	n.d.	n.d.
Ensaio em condições de Verão no Meio ISO 8692	0,41	0,08
Ensaio em condições de Verão na Água Residual Tratada	0,54	0,21
Ensaio em condições de Inverno no Meio ISO 8692	0,11	0,01
Ensaio em condições de Inverno na Água Residual Tratada	0,07	0,02

nd: não determinado

3.7. Taxas específicas de consumo de nutrientes

A divisão da massa de N ou P consumida pela biomassa final obtida na fase estacionária e pelo tempo de ensaio (equação 1.2) permitiu calcular as taxas específicas de consumo de nutrientes por biomassa total formada (Quadro 3.9).

Quadro 3.9. – Taxas específicas de consumo de nutrientes

Ensaio	TEC N (mg N.mg SST ⁻¹ .d ⁻¹)	TEC P (mg P.mg SST ⁻¹ .d ⁻¹)
Ensaio Preliminar no Meio ISO 8692	n.d.	n.d.
Ensaio Preliminar na Água Residual Tratada	n.d.	n.d.
Ensaio em condições de Verão no Meio ISO 8692	0,002	0,001
Ensaio em condições de Verão na Água Residual Tratada	0,004	0,002
Ensaio em condições de Inverno no Meio ISO 8692	0,004	0,0004
Ensaio em condições de Inverno na Água Residual Tratada	0,003	0,0006

nd: não determinado

3.8. Tempos de duplicação celulares

A divisão da constante $\ln 2$ pela taxa específica de crescimento permitiu calcular o tempo de duplicação celular (Quadro 3.10).

Quadro 3.10. – Tempos de duplicação celulares

Ensaio	t_d (d ⁻¹)
Ensaio Preliminar no Meio ISO 8692	2,740
Ensaio Preliminar na Água Residual Tratada	1,397
Ensaio em condições de Verão no Meio ISO 8692	1,055
Ensaio em condições de Verão na Água Residual Tratada	1,612
Ensaio em condições de Inverno no Meio ISO 8692	4,176
Ensaio em condições de Inverno na Água Residual Tratada	3,938

4. DISCUSSÃO

4.1. Alteração da espécie dominante na cultura de microalgas

O inóculo fornecido pelo LNEG não continha apenas *Chlorella vulgaris*. Durante o desenvolvimento das culturas ocorreu a mudança de domínio de espécies no meio artificial e na água residual. Para além disso, a água residual continha outros microrganismos, como microalgas e protozoários. A Figura 4.1 mostra três microalgas que foram encontradas no inóculo.



Figura 4.1. Imagens obtidas da cultura-mãe após 6 dias de incubação. A – *Chlorella vulgaris* (ampliação 400x); B – *Scenedesmus sp.* e *Chlorella vulgaris* (ampliação 400x); C – *Scenedesmus sp* (ampliação 400x)

Nas culturas de microalgas a dominância de espécie pode depender dos predadores, da adaptação ao meio, das necessidades de alimentação ou da razão N:P (Richmond, 2004). Na Figura 4.2 encontra-se um exemplo de protozoário ciliado (provável predador das microalgas) encontrado na água residual inoculada, ao fim de 14 dias de incubação.



Figura 4.2. Imagem de um protozoário ciliado na água residual inoculada, após 14 dias de incubação (ampliação 400x)

A existência de outras microalgas levou a uma mudança das espécies dominantes na cultura. O ensaio que decorreu sob condições de Verão mostrou um domínio inicial da microalga *Chlorella vulgaris*, mas, no seu final, a microalga dominante era do género *Chlamydomonas*, como pode ser visto na Figura 4.3. A não existência da microalga *Chlamydomonas* no inóculo leva a concluir que existia na amostra de água residual.

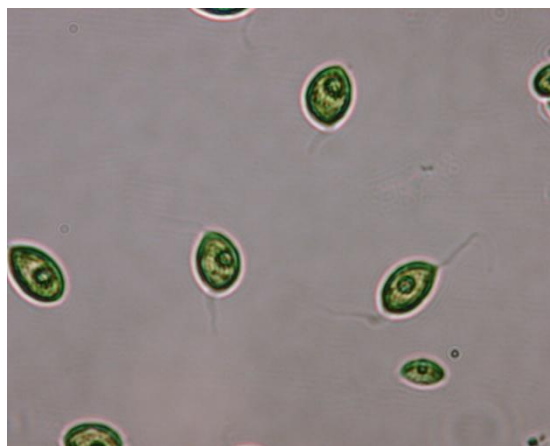


Figura 4.3. – Água residual inoculada, após 14 dias de incubação, mostrando a dominância de *Chlamydomonas* (ampliação 400x)

4.2. Comparação da composição da água residual tratada com alguns dados bibliográficos

No Quadro 4.1. são apresentadas as características físico-químicas de águas residuais utilizadas em trabalhos de crescimento de microalgas.

Quadro 4.1. – Composição de várias águas residuais utilizadas noutros trabalhos

Parâmetro	Unidades	a)	b)	c)	d)	e)
pH	escala Sorensen	7,49	7,6	-	7,2	8,7
Oxigénio dissolvido	mg O ₂ .l ⁻¹	3	-	-	-	2,4
Potencial redox	mV	-	978	-	-	-
Condutividade	µS.cm ⁻¹	-	-	-	-	2900
CQO	mg O ₂ .l ⁻¹	55	49,7	304	-	204
CBO ₅ (20)	mg O ₂ .l ⁻¹	-	-	-	-	41
SST	mg.l ⁻¹	13	-	186	-	-
N-Kjeldahl	mg N.l ⁻¹	18,5	11,9	37	-	-

Quadro 4.1 - (cont.)

Parâmetro	Unidades	a)	b)	c)	d)	e)
NO ₃ ⁻	mg NO ₃ .l ⁻¹	-	0,9	-	0,6	16
NO ₂ ⁻	mg NO ₂ .l ⁻¹	-	0,14	-	-	0,79
Ortofosfatos	mg P.l ⁻¹	-	11,5	-	-	-
P-total	mg P.l ⁻¹	1,32	-	-	-	-
Azoto Amoniacal	mg NH ₄ ⁺ .l ⁻¹	5,4	15	28	2,3	1,9

a) Efluente doméstico após tratamento secundário (Hea e Xueb, 2010)

b) Efluente doméstico após tratamento secundário (Órpeza *et al.*, 2009)

c) Efluente doméstico (Kim *et al.*, 2009)

d) Efluente doméstico após tratamento secundário (Singh e Dhar, 2007)

e) Água residual sintética (Maine *et al.*, 2006)

A água residual que foi utilizada nesta dissertação (Quadro 4.1) era, na generalidade, mais rica em nitratos, nitritos e fosfatos do que as águas residuais apresentadas no Quadro 4.1. Os teores médios de CBO₅(20), CQO e SST, na água residual utilizada nesta dissertação, foram de 4 mg O₂.l⁻¹, 33 mg O₂.l⁻¹ e 23 mg.l⁻¹, respectivamente. Estes três parâmetros demonstram a melhor qualidade da água residual tratada utilizada neste trabalho, pois as concentrações daqueles parâmetros são inferiores aos valores encontrados na bibliografia.

Estas características tornam a água residual utilizada como um meio de cultura mais adequado para o crescimento das microalgas em condições autotróficas, do que as águas residuais indicadas no Quadro 4.1. No entanto, o meio sintético, utilizado nos ensaios, possuía nitratos e fosfatos em maior concentração, com cerca de cinco vezes mais nitratos e duas a três vezes mais fosfatos que a água residual tratada.

4.3. Ensaios de crescimento

4.3.1. Ensaio Preliminar de cultivo em meio ISO 8692

O meio ISO 8692 era um meio de cultura rico em nitratos e fosfatos (Quadro 3.3). A fase exponencial começou, neste meio, no dia 2 de ensaio e manteve-se até ao dia 10 (Figura 3.3A). A taxa de crescimento, $\mu = 0,253 \text{ d}^{-1}$, foi inferior ao ensaio realizado com a água residual tratada, que registou um valor de $\mu = 0,496 \text{ d}^{-1}$ (Quadro 3.4). Uma explicação possível é a pior assimilação de nutrientes por parte das microalgas, ou o

melhor equilíbrio nutritivo na água residual, a qual poderá conter micro-nutrientes essenciais ao crescimento das microalgas que não se encontrariam presentes no meio ISO 8692. O crescimento no ensaio preliminar, em meio sintético, não atingiu os valores do ensaio em condições de incubação de Verão, no mesmo meio, devido à falta de arejamento. O arejamento não só contribui para uma melhor agitação da cultura, como terá promovido uma melhoria das trocas gasosas dentro dos reactores.

4.3.2. Ensaio Preliminar de cultivo na água residual tratada

O crescimento da cultura na água residual tratada esteve em fase exponencial apenas durante 7 dias e sem atingir uma densidade óptica tão elevada como no ensaio preliminar em meio sintético (Figuras 3.3B). No entanto, apresentou uma taxa específica de crescimento, $\mu = 0,496 \text{ d}^{-1}$, superior à do ensaio preliminar em meio sintético, o qual registou uma taxa específica de crescimento de $\mu = 0,253 \text{ d}^{-1}$ (Quadro 3.4).

O valor de densidade óptica final foi inferior ao do ensaio preliminar em meio sintético (Figuras 3.2A e 3.2B) porque as concentrações dos nutrientes eram inferiores.

Finalmente, a falta de arejamento terá tido o mesmo efeito negativo que no ensaio preliminar em meio sintético.

4.3.3. Ensaio de cultivo em condições de Verão no meio ISO 8692

Os resultados da DO e dos SST máximos (Figuras 3.2C e 3.5C) foram os mais elevados registados ao longo de todos os ensaios. A taxa específica de crescimento registada com base na DO, $\mu = 0,657 \text{ d}^{-1}$, e a taxa específica de crescimento determinada com base nos SST, $\mu_b = 0,382 \text{ d}^{-1}$, foram igualmente as mais elevadas registadas em todos os ensaios. Estes valores máximos podem indicar que as condições aqui utilizadas foram as mais próximas das ideais.

O aumento da taxa específica de crescimento em relação aos ensaios preliminares ($\mu = 0,253 \text{ d}^{-1}$ no meio ISO 8692 e $\mu = 0,496 \text{ d}^{-1}$ na água residual tratada) deveu-se provavelmente à alteração no sistema de agitação. No ensaio preliminar, a agitação foi apenas orbital. Nos restantes ensaios, além da agitação orbital, simulou-se também as condições de um reactor *air-lift* com arejamento forçado. Na prática, o que esta

mudança veio acrescentar foram movimentos verticais do meio de cultura em simultâneo com os movimentos horizontais promovidos pela agitação orbital. Para além disso, a maior intensidade de movimentos no interior da cultura terá permitido uma melhor agitação do meio de cultura. Daí resultaram melhores trocas gasosas, como a difusão de O_2 e CO_2 , que terão aumentado a absorção de nutrientes. Igualmente, a acumulação de O_2 pode ser tóxico para os microrganismos, e a falta de CO_2 pode ser um factor limitante do crescimento, daí a importância de uma agitação eficaz.

O ensaio em meio ISO 8692, nas condições de incubação de Verão, apresentou taxas de remoção de N e P de 27% e 67% (Quadro 3.5), respectivamente, relativamente ao tempo de duração total do ensaio, e de 31% e 62 % (Quadro 3.6), respectivamente, no que concerne ao período de duração da fase de crescimento exponencial. A diferença entre as taxas de remoção para todo o ensaio e as taxas de remoção na fase exponencial mostra que se se tiver como principal objectivo a remoção dos nutrientes N e P da água residual tratada, não é interessante manter a cultura em crescimento para além da fase exponencial. Esta conclusão foi comum a todos os ensaios.

Nos primeiros quatro dias do ensaio houve um consumo muito reduzido de azoto (Figura 3.5A), dado que as microalgas terão começado por consumir as reservas internas e só depois terão utilizado o azoto do meio. Este processo é frequentemente observado em inóculos provenientes de meios de cultura ricos em N e P, em que as microalgas efectuem “consumos de luxo” destes nutrientes (Becker, 1994).

As taxas volumétricas de consumo de nutrientes (TVN e TVP de $1,85 \text{ mg N.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e $0,42 \text{ mg P.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente) (Quadro 3.7) e os quocientes metabólicos de utilização de N e P (TV N/TV SST e TV P/TV SST de 0,41 e 0,08, respectivamente) (Quadro 3.7) foram inferiores aos do ensaio com água residual tratada, nas mesmas condições de incubação (TVN e TVP de $2,58 \text{ N.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e $1,03 \text{ P.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente; TV N/TV SST e TV P/TV SST de 0,54 e 0,21, respectivamente).

4.3.4. Ensaio de cultivo em condições de Verão na água residual tratada

Os resultados da DO e biomassa máximos foram inferiores aos obtidos para os ensaios em meio sintético, nas mesmas condições de incubação (Figuras 3.2D e 3.5D). As taxas

específicas de crescimento ($\mu = 0,430 \text{ d}^{-1}$ e $\mu_b = 0,365 \text{ d}^{-1}$) foram também inferiores na água residual tratada (Quadro 3.4). Os valores mais baixos provavelmente são consequência da menor carga de nutrientes na água residual tratada e/ou da existência de predadores neste meio de cultura comparativamente ao meio sintético ISO 8692.

Na água residual tratada foi observado um processo interessante do ponto de vista da aplicação prática do crescimento das microalgas neste meio de cultura: a densidade óptica, ao contrário dos restantes ensaios, não acompanhou o crescimento dos sólidos suspensos totais, devido à flocculação das microalgas, causando interferência nas medições por espectrofotometria. Este resultado é de elevado interesse no sentido em que a possibilidade de se induzir naturalmente a flocculação permitiria baixar os custos associados à separação da biomassa algal do meio líquido. Será importante que, num trabalho futuro, este processo possa ser estudado.

Este ensaio apresentou taxas de remoção de N e P de 84% e 74% (Quadro 3.5), respectivamente, relativamente ao tempo de duração total do ensaio, e de 78% e 52% (Quadro 3.6), respectivamente, no que concerne ao período de duração da fase exponencial.

A evolução da concentração de nutrientes ao longo do ensaio ocorreu em duas fases distintas (Figuras 3.8D e 3.10D): na primeira foi observado um decréscimo muito lento da concentração de N e P, devido provavelmente à pequena dimensão da população de microalgas ou ao consumo de reservas internas existentes nas células; na segunda fase, que globalmente se encontrou ligeiramente desfasada da fase de crescimento exponencial, ocorreu um decréscimo acentuado das concentrações destes nutrientes.

A taxa específica de crescimento no ensaio na água residual tratada, em condições de incubação de Verão, (Quadro 3.4) foi inferior ao ensaio no meio sintético, nas mesmas condições, mas com taxas volumétricas (Quadro 3.7) e quocientes metabólicos de consumo de nutrientes superiores (Quadro 3.8). Isto indica que, na água residual tratada, é necessária uma maior absorção de nutrientes para a manutenção do crescimento microalgal. Isto pode resultar de uma razão desadequada de nutrientes e

da existência de condições de predação mais acentuadas na água residual, diminuindo a competição pelos nutrientes.

4.3.5. Ensaio de cultivo em condições de Inverno no meio ISO 8692

No ensaio de cultivo das microalgas no meio ISO 8692, em condições de Inverno, foram registados os valores mais baixos de DO e biomassa máximos (Figuras 3.2E e 3.5E) comparativamente a todos os ensaios realizados. As taxas específicas de crescimento ($\mu = 0,166 \text{ d}^{-1}$ e $\mu_b = 0,126 \text{ d}^{-1}$) foram igualmente as mais baixas (Quadro 3.4). Estes valores foram condicionados pelas condições desfavoráveis de temperatura e fotoperíodo testados neste ensaio.

Foram calculadas, para este ensaio, taxas de remoção de N e P de 35% e 50%, respectivamente, no período de duração total do ensaio (Quadro 3.5), e de 24% e 50%, respectivamente, no período de duração da fase de crescimento exponencial (Quadro 3.6). Estas taxas de remoção são semelhantes às taxas obtidas no mesmo meio de cultura, nas condições de incubação de Verão. Este facto demonstra que, apesar do crescimento ter demorado mais 7 dias em condições de incubação de Inverno, foi possível obter-se taxas de remoção semelhantes às observadas para as condições mais favoráveis de crescimento (condições de incubação que simulavam o Verão).

As taxas volumétricas de remoção de N e P (Quadro 3.7), calculadas para o ensaio nas condições de incubação de Inverno, foram muito inferiores às determinadas no ensaio realizado sob condições de incubação de Verão. Os quocientes metabólicos de assimilação de N e P (Quadro 3.8) mostram que foi consumido mais azoto do que nos ensaios realizados em condições de Verão para se obter um valor de biomassa muito inferior. Isto indica que houve um elevado consumo de N sem tradução prática em termos de produção de biomassa final.

4.3.6. Ensaio de cultivo em condições de Inverno na água residual tratada

No ensaio de cultivo na água residual tratada, em condições de incubação de Inverno, as taxas específicas de crescimento ($\mu = 0,176 \text{ d}^{-1}$ e $\mu_b = 0,159 \text{ d}^{-1}$) (Quadro 3.4) foram inferiores às registadas nos ensaios em condições de Verão, mas superiores às determinadas no ensaio de crescimento no meio ISO 8692, em condições de Inverno. À

semelhança do que aconteceu no ensaio de crescimento no meio ISO 8692, em condições de incubação de Inverno, as condições de incubação de baixa temperatura e reduzido período de exposição à luz foram determinantes na obtenção de valores reduzidos das taxas de crescimento.

Para este ensaio foram determinadas taxas de remoção de N e P de 84% e 56%, respectivamente, para todo o período de duração do ensaio (Quadro 3.5). Estas taxas foram semelhantes ou superiores às que foram determinadas para os restantes ensaios de crescimento. Concluiu-se assim que, apesar de se ter registado um crescimento relativamente reduzido devido às condições de incubação desfavoráveis ao crescimento microalgal, as condições de temperatura e período de exposição à luz reduzidos não condicionaram significativamente a remoção de N e P a partir da água residual. Uma possível explicação é a de que, em condições ambientais adversas, as microalgas incorporam nutrientes na sua biomassa, funcionando como reservas, ao invés de os utilizar para o crescimento. Estas reservas poderão ficar guardadas até existirem condições ambientais que promovem um crescimento eficaz (Meseck, *et al.*, 2005).

Outra explicação é sugerida no estudo de Seyfabadi *et al.* (2010), que explica as reacções da *Chlorella vulgaris* em resposta às alterações de regimes luminosos. As principais conclusões deste estudo dizem que, em resposta à baixa irradiância, decresce a produção de clorofila a, aumenta a produção de β – caroteno e são sintetizadas unidades fotossintéticas maiores, fenómenos estes que necessitam de energia e consequentemente nutrientes. Estes fenómenos metabólicos podem explicar a absorção significativa de nutrientes, apesar destes não serem conduzidos para o crescimento celular.

As taxas volumétricas de assimilação de N e P (Quadro 3.7), em conjunto com os quocientes metabólicos de assimilação destes nutrientes (Quadro 3.8), mostram que se consumiu menos N, mas mais P, para se obter uma quantidade superior de sólidos suspensos, comparativamente ao meio ISO 8692, nas mesmas condições de incubação.

4.4. Razão N:P

A razão N:P no meio de cultura é um dos factores que determina a dominância das espécies na cultura, podendo também afectar a absorção de nutrientes e a taxa fotossintética (Wehr e Sheath, 2003). A melhor razão N:P para o crescimento varia consoante a microalga.

A composição da *Chlorella vulgaris* apresenta uma razão N:P que pode variar de 6:2 até 8:1 (Quadro 4.2) A composição interna do microrganismo é um bom ponto de partida para determinar a constituição ideal do meio externo.

Quadro 4.2. – Constituição da microalga *Chlorella vulgaris* (Oh-Hama e Miyachi, 1988)

Elemento	% Peso seco
Carbono	51,4-72,6
Oxigénio	11,6-28,5
Hidrogénio	7,0-10,0
Azoto	6,2-7,7
Fósforo	1,0-2,0
Potássio	0,85-1,62
Magnésio	0,36-0,80
Enxofre	0,28-0,39
Ferro	0,04-0,55
Cálcio	0,005-0,08
Zinco	0,0006-0,005
Cobre	0,001-0,004
Magnésio	0,002-0,01

Nos ensaios realizados, aquele que apresentou melhores índices de crescimento foi o ensaio com o meio sintético ISO 8692, em condições de incubação de Verão. A razão N:P para este ensaio foi de 8:1 (Quadro 3.3). No ensaio realizado no meio sintético, em condições de Inverno, a razão N:P foi de 20:1. Este ensaio apresentou as taxas de crescimento e as taxas de remoção de nutrientes mais baixas da globalidade dos ensaios (Quadros 3.4 e 3.5). O facto dos melhores índices de crescimento terem ocorrido num meio com uma razão N:P de 8:1 está de acordo com o trabalho de Oh-Hama e Miyachi (1988), no qual o autor sugere que a razão N:P da constituição da

microalga *Chlorella vulgaris* (de 6:2 até 8:1) pode representar a razão N:P ideal para o meio de crescimento.

É ainda interessante notar que os ensaios que utilizaram meios de cultura com razões N:P mais baixos, 2:1 na água residual tratada, em condições de Verão, e 4:1 na água residual tratada no ensaio preliminar, foram os que apresentaram as taxas de remoção de nitratos e fosfatos mais elevadas. Isto poderá indicar um melhor comportamento de absorção de nutrientes em razões N:P inferiores.

5. Conclusões

O objectivo principal deste trabalho foi o estudo da cinética de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual. Pretendeu-se também avaliar a taxa de remoção dos nutrientes N e P no decurso do crescimento algal.

Este trabalho mostrou que a água residual tratada foi um meio no qual as taxas de remoção de N e P, de 84% e 74%, respectivamente, nas condições de incubação de Verão, e de 84% e 56%, respectivamente, nas condições de incubação de Inverno, foram superiores às taxas de remoção registadas no meio sintético, as quais foram de 37% e 67% da concentração inicial, respectivamente, nas condições de incubação de Verão, e de 35% e 50% da concentração inicial, respectivamente, nas condições de incubação de Inverno. No entanto, a água residual tratada foi um meio que não promoveu um crescimento microalgal tão acentuado quanto o que foi observado no meio sintético, devido ao facto das concentrações iniciais de N e P terem sido inferiores na água residual tratada. Para além disso, a água residual tratada pode também apresentar outros factores que prejudicam o crescimento microalgal, como microalgas que competem com as microalgas do inóculo utilizado e predadores que afectam negativamente o crescimento das microalgas.

O ensaio preliminar, no meio sintético, apresentou uma taxa de crescimento relativamente à DO, μ , de $0,253\text{ d}^{-1}$. O mesmo ensaio realizado com a água residual tratada apresentou um valor de μ igual a $0,496\text{ d}^{-1}$.

O ensaio nas condições de incubação de Verão, em meio sintético, registou uma taxa específica de crescimento, determinada com base na DO, de $\mu = 0,657\text{ d}^{-1}$ e uma taxa específica de crescimento, determinada com base nos SST, de $\mu_b = 0,382\text{ d}^{-1}$. O facto destas taxas terem sido as mais elevadas das que foram obtidas em todos os ensaios permitiu concluir que as condições de incubação, que foram utilizadas nas condições de simulação de Verão, terão sido as mais favoráveis ao crescimento microalgal, devido ao maior número de horas de exposição à luz e à maior temperatura ensaiada.

O ensaio em meio sintético, nas condições de incubação de Verão, apresentou taxas de remoção de N e P de 37% e 67% da concentração inicial, respectivamente, relativamente ao tempo de duração total do ensaio, e de 31% e 62 % da concentração inicial, respectivamente, no que diz respeito ao período de duração da fase exponencial. As diferenças entre estas taxas de remoção de nutrientes não são significativas, pelo que se pode concluir que não será vantajoso, tendo como objectivo específico a remoção de nutrientes, manter a cultura em crescimento para além da fase exponencial.

A alteração do sistema de agitação, entre os ensaios preliminares e os ensaios em condições de Verão, provocou uma melhoria no sistema de crescimento das microalgas. Concluiu-se que o crescimento com sistema de arejamento do tipo “air-lift” permite melhorar a agitação da cultura, bem como as trocas gasosas no interior do reactor, o que conduz ao aumento do crescimento microalgal.

O ensaio de crescimento na água residual tratada, em condições de incubação de Verão, apresentou taxas específicas de crescimento de $\mu = 0,430 \text{ d}^{-1}$ e $\mu_b = 0,365 \text{ d}^{-1}$, relativamente à DO e aos SST, respectivamente, valores estes que foram inferiores aos determinados para o meio sintético, nas mesmas condições de incubação. Como já foi referido, a água residual tratada não é o meio ideal para maximizar a produção de biomassa microalgal, pois é um meio mais pobre em nutrientes e a existência de predadores é prejudicial ao desenvolvimento da cultura de microalgas. No entanto, os ensaios com condições de incubação de Verão apresentaram as taxas de remoção de N e P mais elevadas, o que pode indicar que a água residual tratada foi o meio de crescimento com o melhor equilíbrio nutricional em micro-nutrientes, podendo satisfazer necessidades nutricionais que o meio sintético não terá satisfeito por ausência desses micro-nutrientes.

O ensaio no meio sintético, em condições de incubação de Inverno, apresentou as taxas específicas de crescimento ($\mu = 0,166 \text{ d}^{-1}$ e $\mu_b = 0,126 \text{ d}^{-1}$) mais baixas de todos os ensaios. Foram calculadas para este ensaio taxas de remoção de N e P de 35% e 50% da concentração inicial, respectivamente, no período de duração total do ensaio, e de

24% e 50% da concentração inicial, respectivamente, no período de duração da fase de crescimento exponencial.

No ensaio de cultivo na água residual tratada, em condições de incubação de Inverno, as taxas específicas de crescimento para a DO e para os SST, $\mu = 0,176 \text{ d}^{-1}$ e $\mu_b = 0,159 \text{ d}^{-1}$, foram inferiores às taxas registadas nos ensaios em condições de Verão, mas superiores às determinadas no ensaio de crescimento no meio ISO 8692, em condições de Inverno. Para este ensaio foram determinadas taxas de remoção de N e P de 84% e 56% da concentração inicial, respectivamente, para todo o período de duração do ensaio, e taxas de remoção de 73% e 56% da concentração inicial, respectivamente, no período de duração da fase de crescimento exponencial.

As taxas específicas de crescimento (μ e μ_b) apresentaram-se com valores inferiores nos ensaios em condições de incubação de Inverno, comparativamente aos ensaios em condições de incubação de Verão, o que indica que, no que concerne o crescimento microalgal, a temperatura de 10°C e um fotoperíodo de 6h (luz)/18h (escuro), limitaram significativamente o crescimento da população de microalgas ensaiada. No entanto, as taxas de remoção de nutrientes registadas nos ensaios realizados em condições de incubação de Inverno foram semelhantes ou superiores às que foram determinadas para os restantes ensaios de crescimento. Concluiu-se assim que, apesar de se ter registado um crescimento reduzido devido às condições de incubação desfavoráveis ao crescimento microalgal, as condições de temperatura e fotoperíodo, que simularam a estação do Inverno, não condicionaram a remoção de N e P a partir da água residual, pelo que, num sistema de remoção de nutrientes que utilize uma população de microalgas semelhante à que foi testada neste trabalho, registar-se-á a remoção de N e P da água residual, mesmo sob condições meteorológicas adversas de temperatura e fotoperíodo.

6. Trabalho Futuro

O trabalho desta dissertação correspondeu a uma fase preliminar do que poderá ser um projecto com ambições mais amplas de produção de microalgas em águas residuais provenientes de tratamentos secundários. O objectivo a longo prazo deste projecto seria a utilização de microalgas para depuração de águas residuais em ETARs em Portugal. Para se atingir este objectivo, o desenvolvimento de trabalho futuro nas áreas referidas seguidamente é fundamental.

Numa próxima fase de testes seria importante testar condições de temperatura e fotoperíodo intermédias às que foram estudadas nesta dissertação, nomeadamente condições de Primavera e Outono. A análise de uma maior gama de valores de temperatura e fotoperíodo permitiria avaliar a produtividade do sistema relativamente à produção de biomassa e a eficiência de remoção de N e P ao longo de um ciclo anual completo. Por outro lado, a determinação da temperatura e fotoperíodo ideais para o crescimento é essencial para se escolher à escolha de locais com condições meteorológicas que permitam maximizar a produção de biomassa microalgal.

Seria também importante o estudo de outras espécies de microalgas, que pudessem garantir maiores taxas de produção de biomassa, sem comprometer os rendimentos de remoção de nutrientes e sem apresentarem maiores sensibilidades aos factores limitantes associados a águas residuais, nomeadamente, competição e predação.

Finalmente, será também importante que os próximos ensaios sejam realizados em reactores com maiores volumes, constituindo reactores piloto, de modo a que outras variáveis possam ser estudadas, nomeadamente a qualidade da biomassa produzida. Só assim será possível evoluir-se do laboratório para a ETAR, onde seria instalado um reactor a utilizar água residual com as condições meteorológicas locais. Finalmente, esta passagem do laboratório para trabalho de campo seria mais interessante se acompanhado de um estudo de viabilidade económica para se avaliar os custos e receitas reais da implementação desta tecnologia.

7. Bibliografia

7.1. Referências Bibliográficas

ALTENER (2004) *Bioenergia - Manual sobre Tecnologias, Projectos e Instalação*.

Bangqin, H.; Huasheng, H. e Liang, C. (1994) The physiological effects of N:P ratio on algae in semicontinuous culture, *Asian Marine Biology*, Vol. 11, pp. 137-142.

Barbosa, M. (2003) *Microalgal Photobioreactors: Scale-up and Optimisation*, Universidade de Wageningen.

Becker, E. (1994) *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*, Cambridge University Press.

Borodyanski, G. e Konstantinov, I. (2002) *Microalgae separator apparatus and method*, US Pat. 6524486.

Borowitzka, M. (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters, *Journal of Biotechnology*, 70, pp. 313-321.

Bosma, R. (2006) *Ultrasound: A new technique to harvest microalgae?*, Universidade Twente.

Bouterfas, R.; Belkoura, M. e Dauta, A. (2006) The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake, *Limnetica*, 25, Vol. 3, pp. 647-656.

Carlsson, A.; Beilen, J.; Moller, R. e Clayton, D. (2007) *Micro and Macro-Algae: Utility for industrial applications*, CPL Press.

Carvalho, A.; Meireles, L. e Malcata, F. (2006) Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances.

Chinnasamy, S.; Ramakrishnan, B.; Bhatnagar, A. e Das, K. (2009) Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of carbon dioxide and temperature, *International Journal of Molecular Sciences*, 10, pp. 518-532.

Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances*, 25, pp. 294-306.

De la Noue, J. e Chevalier, P. (1985) Efficiency of immobilized hyperconcentrated algae for ammonium and orthophosphate removal from wastewaters, *Biotechnology Letters*, 7, pp. 395-400.

De la Noue, J.; Laiberté, G. e Proulx, D. (1992) Algae and wastewater, *Journal of Applied Phycology*, 4, pp. 247-254.

De la Noue, J. e De Pauw, N. (1998) The Potential of microalgal biotechnology: a review of production and microalgal uses, *Biotechnology Advances*, 6, pp. 725-770.

Dermibas, A. (2008) *Biodiesel*, 1ª edição, Trabzon, Springer - VLL

Dimitrov, K. (2007) *GreenFuel technologies: A case study for industrial photosynthetic energy capture*.

Dinis, A.; Monteiro, A. e Boaventura, R. (2004). *O tratamento de águas residuais: O papel das microalgas*, Universidade do Porto.

Doucha, J. e Livansky, K. (2006) Productivity, carbon dioxide/oxygen exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in middle and southern european climate, *Journal of Applied Phycology*, 18, pp. 811-826.

Eriksen, N. (2008) The technology of microalgal culturing, *Biotechnology Letters*, 30, pp. 1525-1536.

Fernandez, F.; Camacho, F.; Perez, J.; Sevilla, J. e Grima, E. (1998) Modeling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: Effects of dilution rate, tube diameter, and solar irradiance, *Biotechnology and Bioengineering*, 58, pp. 605-616.

Fonseca, M. e Teixeira, J. (2007) *Reactores Biológicos*, 1ª edição, Lisboa, Lidel - edições técnicas, lda.

Goluecke, C.; Gotaas, H. e Oswald, W. (1957) Anaerobic digestion of algae, *Applied Microbiology*, 5, Vol. 1, pp. 47-55.

González, J.; Diaz, P.; Arbib, Z.; Pérez, C.; Sánchez, J. e Vargas-Machuca, J. (2010) Nitrogen and phosphorus removal from treated urban wastewater by *Chlorella vulgaris*, *International Journal of Phytoremediation*, Em publicação.

González, M. (2005) *Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales*, Universidad Autónoma Metropolitana.

Gouveia, L. e Oliveira, A. (2009) Microalgae as raw materials for biofuels production, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Vol. 36, pp. 269-274.

Gouveia, L.; Marques, A.; Sousa, J.; Moura, P. e Bandarra, N. (2010) Microalgae – Source of natural bioactive molecules as functional ingredients, *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 7, Vol. 2, pp. 21-37.

Green, B.; Lunquist, T. e Oswald, W. (1994) Performance of methane fermentation pits in advanced integrated wastewater pond systems, *Water Science and Technology*, 12, Vol. 30, pp. 287-295.

Green, B.; Lunquist, T. e Oswald, W. (1995a) Energetics of advanced integrated wastewater pond systems, *Water Science and Technology*. 12, Vol. 31, pp. 9-20.

Green, B.; Bernstone, L.; Lunquist, T.; Muir, J.; Tresan, R. e Oswald, W. (1995b) Methane fermentation, submerged gas collection, and the fate of carbon in advanced integrated wastewater pond systems, *Water Science and Technology*, 12, Vol. 31, pp. 55-65.

Green, B.; Bernstone, L.; Lunquist, T. e Oswald, W. (1996) Advanced integrated wastewater pond systems for nitrogen removal, *Water Science and Technology*, 7, Vol. 33, pp. 207-217.

Grima, E.; Camacho, F.; Perez, J.; Fernandez, F. e Sevilla, J.M (1999) Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup, *Journal of Biotechnology*, 70, pp. 231-247.

Grupo de Trabalho do Atlas (1988) *Radiação Solar*, Secretaria de Estado do Ambiente e Recursos Naturais – Lisboa.

Guimarães, J.; Amaral, R.; Santos, M. e Santos, L. (2009) *Colheita, Identificação e Conservação de Microalgas*, Algoteca do Departamento de Botânica - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.

Hall, D.; Acien Fernandez, F.; Guerrero, E.; Rao, K. e Grima, E.M. (2003) Outdoor helical tubular photobioreactors for microalgal production: Modeling of fluid-dynamics and mass transfer and assessment of biomass productivity, *Biotechnology and Bioengineering*, 82, pp. 62-73.

Hameed, M. e Ebrahim, O. (2007) Biotechnological potential uses of immobilized algae, *International Journal of Agriculture & Biology*, 9, Vol. 1, pp. 183-192.

Hea, S. e Xueb, G. (2010) Algal-based immobilization process to treat the effluent from a secondary wastewater treatment plant, *Journal of Hazardous Materials*, 178 , pp. 895–899.

Hoffmann, J. (1998) Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae, *Journal of Phycology*, 34, pp. 757-763.

Hu, Q. (2004) Environmental effects on cell composition, *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied Phycology*, pp. 83-87.

IBGE (2004) *Vocabulário básico de recursos naturais e meio ambiente*, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

Illman, A.; Scragg, A. e Shales, S. (2000) Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, pp. 631-635.

Jones, L. e Atkins, P. (2000) *Chemistry: Molecules, Matter and Change*, 4ª edição, W.H. Freeman.

Kim, D.; Kim, K.; Ryu, H.; Min, K. e Lee, S. (2009) Long term operation of pilot-scale biological nutrient removal process in treating municipal wastewater, *Bioresource Technology*, 100, pp. 3180–3184.

Klok, A. (2010) *Optimization of lipid production in microalgae*, Wageningen University

Kok, B. (1952) On the efficiency of Chlorella growth, *Acta Botanica Neerlandica*, 1952, p. 445.

Lau, P.; Tam, N. e Wong, Y. (1995) Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater, *Environmental Pollution*, 89, pp. 59 - 66.

Lau, P.; Tam, N. e Wong, Y. (1997) Wastewater nutrientes (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized Chlorella vulgaris, *Environmental Technology*, 18, pp. 945 - 951.

Lee, Y. e Shen, H. (2004) Basic culturing techniques. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied Phycology*, pp. 40-56.

Li, J.; Xu, N. e Su, W. (2003) Online estimation of stirred-tank microalgal photobioreactor cultures based on dissolved oxygen measurement, *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 14, pp. 51-65.

Li, Y.; Horsman, M.; Wu, N.; Lan, C. e Dubois-Calero, N. (2008) *Biofuels from Microalgae*,

Lim, S.; Chu, W. e Phang, S. (2010) Use of Chlorella vulgaris for bioremediation of textile wastewater, *Bioresource Technology*, 101, pp. 7314-7322.

Maine, M.; Sune, N.; Hadad, H.; Sanchez, G. e Bonetto, C. (2006) Nutrient and metal removal in a constructed wetland for wastewater treatment from a metallurgic industry, *Ecological Engineering*, 26, pp. 341-347.

Mallick, N. (2002) Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal, *BioMetals*, 15, pp. 377-390.

Mathews, C.; van Holde, K. e Ahern, K. (2000) *Photosynthesis - Biochemistry*. 3ª edição, p. 619.

- Meseck, S.; Alix, J. e Wikfors, G. (2005) Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chui* (PLY429), *Aquaculture*, 246, pp. 393-404.
- Moreno-Garrido, I. (2008) Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource Technology*, 99, pp. 3949-3964.
- Oh-Hama, T. e Miyachi, S. (1988) Chlorella. *Microalgal Biotechnology*, pp. 3-26.
- Órpeza, R.; Martínez, M.; Hodaifac, G.; El Yousfi, F.; Nohman, J. e Sánchez, S. (2009) Growth of the microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage, *Desalination*, 256, pp 625-630.
- Oswald, W. (1990) *Advanced integrated wastewater pond systems*, 1ª edição.
- Oswald, W. (1995) Ponds in the twenty-first century, *Water Science and Technology*, 12, Vol. 31, pp. 1-8.
- Rhee, G. e Gotham, I. (1980) Optimum N:P ratios and coexistence of planktonic algae. *Journal of Phycology*, 4, Vol. 16, pp. 486-489.
- Richmond, A. (2004) *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology*, 1ª edição, Blackwell Science Ltd.
- Ruiz-Marin, A. e Mendoza-Espinosa, L. (2008) Ammonia removal and biomass characteristics of alginate-immobilized *Scenedesmus obliquus* cultures treating real wastewater, *PSP*, 9a, Vol. 17.
- Ruiz-Marin, A.; Mendoza-Espinosa, L.; e Stephenson, T. (2010) Growth and Nutrient Removal in Free and Immobilized Green Algae in Batch and Semi-continuous Cultures Treating Real Wastewater, *Bioresource Technology*, 2010, Vol. 101, pp. 58-64.
- Sadava, D.; Hillis, D.; Heller, C. e Berenbaum, M. (2009) *Life: The Science of Biology*, 8ª edição, W.H. Freeman.
- Salisbury, F. e Ross, C. (1985) *Plant Physiology*, 3ª edição, Brooks Cole.
- Sawayama, S.; Inoue, S.; Dote, Y. e Yokoyama, S. (1995) CO₂ fixation and oil production through microalgae, *Energy Conversion Management*, Vol. 36, pp. 729-31.
- Seyfabadi, J.; Ramezani, Z. e Khoeyi, Z. (2010) Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes, *Journal of Applied Phycology*.
- Sheehan, J. (1998) *A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program—Biodiesel from algae*, U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development.

- Shi, J.; Podola, B. e Melkonian, M. (2007) Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study, *Journal of Applied Phycology*, 19, pp. 417–423.
- Singh, K. e Dhar, W. (2007) Nitrogen and phosphorous scavenging potential in microalgae, *Indian Journal of Biotechnology*, 6, pp. 52-56.
- Soeder, C. (1981) Productivity of microalgal systems in wastewater for aquaculture, *University of the OFS Publication, Series C, Nº3*.
- Soeder, C. (1986) A historical outline of applied phycology. *Handbook of Microalgal Mass Culture*, pp. 25-41.
- Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E. e Isambert, A. (2006) Commercial applications of microalgae, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, pp. 87–96.
- Suttle, C. e Harrison, P. (1988) Ammonium and phosphate uptake rates, N:P supply ratios, and evidence for N and P limitation in some oligotrophic lakes, *Limnology and Oceanography*, 33, Vol. 2, pp. 186-202.
- Tamiya, H. (1957) Mass culture of algae, *Annual Review of Plant Physiology*, 8, pp. 309-334.
- Tchobanoglous, G.; Burton, F. e Stensel, D. (2003) *Wastewater engineering: Treatment and Reuse*, 4ª edição, McGraw-Hill Science.
- Tomaselli, L. (2004) The microalgal cell, *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied Phycology*, p. 3.
- Ugwu, C.; Aoyagi, H. e Uchiyama, H. (2008) Photobioreactors for mass cultivation of algae, *Bioresource Technology*, 99, pp. 4021–4028.
- Vonshak, A. (1986) Laboratory techniques for the cultivation of microalgae, *Handbook of microalgal mass culture*, pp. 117-145.
- Wehr, J. e Sheath, R. (2003) *Freshwater algae of North America - Ecology and classification*, 1ª edição, Academic Press.

7.2. Recursos da Internet Consultados

Algomed (2008)
<http://www.algomed.de/index.php> [Citação: 25 de Agosto de 2010.].

Azevedo, R. (2003)
<http://www.naturlink.pt>. [Citação: 20 de Agosto de 2010.]

CIA (2010)

<https://www.cia.gov/library/publications/the-worldfactbook/rankorder/2417.html>

[Citação: 23 de Outubro de 2010.]

FAO (2011a)

<http://www.fao.org/docrep/007/y5720e/y5720e08.html> [Citação: 18 de Abril de

2011.]

FAO (2011b)

<http://www.fao.org/DOCREP/003/W3732E/w3732e06.htm#2.3.%20Algal%20production> [Citação: 18 de Abril de 2011.]

Garcia, R. (2009)

<http://static.publico.clx.pt/copenhaga/noticia.aspx?id=1414663> [Citação: 23 de 10 de

2010.]

Sequeira, I. (2010)

http://economia.publico.pt/Noticia/galp-e-petrobras-preparam-novos-negocios-na-producao-de-biocombustiveis_1437680 [Citação: 23 de Outubro de 2010.]

Simarsul, Grupo Águas de Portugal. (2010)

www.simarsul.pt. [Citação: 8 de Janeiro de 2011.]